

Filière Technologies du vivant

Orientation Technologie alimentaire

Diplôme 2011

Emilie Henry

Analyse PCR
des gènes des entérotoxines
de *Staphylococcus*
dans une matrice alimentaire

Dozent Bruno Schnyder
Experte Hans Ulrich Graber

Emilie Henry

Titre / Titel

PCR-Analyse der *Staphylococcus* Entererotoxin-Gene in Lebensmitteln

Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele

Die mikrobiellen *Staphylococcus* Enterotoxine (SE) verursachen eine Lebensmittelvergiftung. Der heute existierende Nachweis der SE Toxine ist nicht optimal. Dies ist einerseits auf den indirekten Nachweis der SE, durch Kopplung an Coagulase-Positivität zurückzuführen. Andererseits ist dies auch auf eine von 8 auf 21 angewachsene Anzahl verschiedener SE Toxingene zurückzuführen. Eine verbesserte Nachweismethode der SE soll die Sicherheit vor SE-Lebensmittelvergiftung verbessern, beispielsweise durch eine PCR-Analyse die alle 21 SE-Toxingene einschliesst. Des Weiteren soll der PCR-Nachweis die Sicherheit gewähren dass die als SE-negativ und ungefährlich deklarierten *Staphylococcus* Keime, die im Labor als Referenzstämme gebraucht werden, tatsächlich SE-negativ sind. Damit soll eine Basis gelegt werden, wie man in einer zweiten Stufe den Prozess der Lebensmittelverarbeitung hinsichtlich *Staphylococcus* Toxinen kontrollieren kann.

- Bestimmung der Wachstumskurve von *Staphylococcus* Keimen mit unterschiedlichen SE-Profilen in Anreicherungsmedium.
- Bestimmung eines optimalen Anreicherungsmediums der *Staphylococcus* Keime, die SE-positiv aber nicht zwingend Coagulase-positiv sind.
- Optimierung der Extraktion der DNA, die die SE-Gene beinhaltet, durch Lysostaphin Verdauung, was zusammen mit dem ausgewählten Anreicherungsmedium zur Optimierung der PCR Amplifikation der 21 SE-Gene führen soll.
- Auswahl treffen und Austesten von typischen Referenz-Mikroorganismen, die SE-negativ sind und für die mikrobielle Qualitätskontrolle von Lebensmitteln relevant sind.
- Bestimmung der Nachweisgrenze (Anreicherung gefolgt von der PCR-Analyse) der *Staphylococcus* Keime in Lebensmitteln wie Dessert-Crème oder Weichkäse.

Délais / Termine

 Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:
 02.05.2011

 Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten:
 02.09.2011

 Fin des travaux de diplôme dans les laboratoires de l'école /
 Ende der Diplomarbeiten in den Labors der Schule:
 15.07.2011

 Défense orale / Mündliche Verteidigung:
 dès la semaine 35 / ab Woche 35

 Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts:
 19.08.2011 | 12h00

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum

 Responsable de la filière
 Leiter des Studiengangs:

¹ Etudiant/Student:

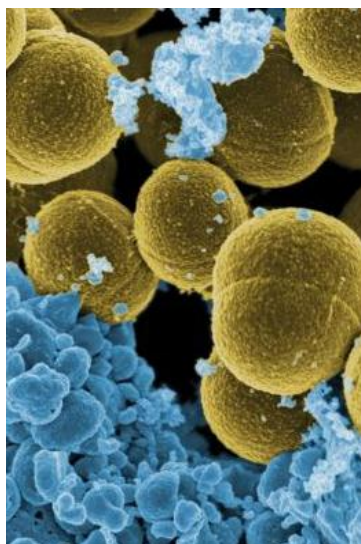
¹ Par sa signature, l'étudiant-e s'engage à respecter strictement la directive et le caractère confidentiel du travail de diplôme qui lui est confié et des informations mises à sa disposition.

Durch seine Unterschrift verpflichtet sich der Student, die Richtlinie einzuhalten sowie die Vertraulichkeit der Diplomarbeit und der dafür zur Verfügung gestellten Informationen zu wahren.

Rapport reçu le / Schlussbericht erhalten am Visa du secrétariat / Visum des Sekretariats

SI	TV
X	X

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr 2010/2011	No TD / Nr. DA ta/2011/9
Mandant / Auftraggeber <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Ecole hôte	Etudiant / Student Emilie Henry	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Ecole hôte
Professeur / Dozent Bruno Schnyder	Expert / Experte (données complètes) Hans Ulrich Graber	
Travail confidentiel / vertrauliche Arbeit <input type="checkbox"/> oui / ja <input checked="" type="checkbox"/> non / nein	Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld—Posieux ALP Schwarzenburgstrasse 161 303 Bern	



Analyse PCR des gènes des entérotoxines de *Staphylococcus* dans une matrice alimentaire

Diplômant/e Emilie Henry

Objectif du projet

Méthode PCR pour la détection des gènes des entérotoxines staphylococciques dans une matrice alimentaire en une seule réaction, optimisation de la sélectivité des conditions d'enrichissement et d'extraction d'ADN à *S. aureus*, avant la PCR.

Méthodes | Expériences | Résultats

Différentes souches de *S. aureus* produisant les diverses entérotoxines, ainsi que des souches autres que *S. aureus* ont été sélectionnés afin de déterminer la sélectivité aux entérotoxines *Staphylococcique* des méthodes employées en présence de la matrice alimentaire, la crème dessert vanille.

Suite à des essais de croissance, un milieu d'enrichissement sélectif et optimal à *S. aureus* a pu être déterminé : Tryptic Soy Broth plus 15% de NaCl. Le milieu permet un développement optimal des staphylocoques et une inhibition des souches de non *S. aureus*. En ce qui concerne l'étape d'extraction d'ADN, le traitement des bactéries avec la lysostaphine ne permet pas d'augmenter la sélectivité de la méthode à *S. aureus*.

La PCR a été effectuée à l'aide de l'enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase et des 49 amorces codant les gènes des 21 différentes entérotoxines. Les résultats constatés montrent des produits PCR de taille entre 100 et 200 pb pour les différentes toxines analysées. La formation de dimères d'amorces et de grands fragments d'ADN n'a pu être éliminée. De plus, la présence de la denrée alimentaire provoque la formation de produits non spécifiques.

Travail de diplôme | édition 2011 |

Filière

Technologies du vivant

Domaine d'application

*Orientation technologie
alimentaire*

Professeur responsable

Dr Schnyder Bruno
Bruno.Schnyder@hevs.ch

HES-SO Valais
Route du Rawyl 47
1950 Sion

Tél. 027 606 85 11
URL www.hevs.ch

Table des matières

1. Introduction	7
1.1. Staphylococcus aureus et toxi-infection alimentaire	7
1.2. Entérotoxines staphylococciques (SEs).....	8
1.2.1. Localisation et régulation des gènes d'entérotoxines staphylococciques	9
1.2.2. Détection des entérotoxines staphylococciques	10
1.3. Méthodes PCR (Polymerase Chain Reaction).....	10
1.3.1. PCR classique.....	10
2.3.1.1. Détection des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose	11
1.3.2. PCR en temps réel	11
1.3.3. La multiplex PCR.....	12
1.4. Objectifs	12
2. Matériel et méthodes.....	13
2.1. Matériel	13
2.1.1. Souches	13
2.1.2. Milieux, réactifs et produits	14
2.1.3. Equipement et appareillage	16
2.2. Méthodes	17
2.2.1. Revitalisation des souches	17
2.2.2. Sélection du milieu d'enrichissement sélectif pour <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.2.3. Croissance des souches dans le milieu d'enrichissement sélectif.....	18
2.2.4. Extraction de l'ADN génomique	19
2.2.5. Analyse qualitative de l'ADN extrait	20
2.2.6. Analyse quantitative de l'ADN extrait	20
2.2.7. Sélection de la méthode PCR pour l'identification des gènes de toxines de <i>S. aureus</i>	20
2.2.7.1. Choix de l'enzyme et des conditions de cycles pour les réactions PCR	20
2.2.7.2. Optimisation de la méthode PCR.....	21
2.2.7.3. Application de la méthode PCR sélectionnée	23
2.2.8. PCR en temps réel (qPCR)	23
2.2.9. Analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose	24
3. Résultats.....	25
3.1. Sélection de la matrice alimentaire et des souches utilisées lors de ce travail.....	25
3.2. Sélection du milieu d'enrichissement sélectif et optimal à la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.3. Croissance des souches dans le milieu d'enrichissement sélectif	27
3.4. Extraction d'ADN avec la lysostaphine	30

3.5. Sélection d'une méthode PCR pour la détection des entérotoxines staphylococciques	31
3.5.1. Choix de l'enzyme et des conditions PCR	31
3.5.2. Optimisation de la méthode PCR.....	34
3.6. Détection des entérotoxines staphylococciques	37
3.7. Comparaison méthode avec real-time PCR (projet staphtox)	42
4. Discussion	43
4.1. Sélection de la matrice alimentaire et des souches utilisées lors de ce travail.....	43
4.2. Sélection du milieu d'enrichissement sélectif et optimal à la croissance de Staphylococcus aureus.....	43
4.3. Croissance des souches dans le milieu d'enrichissement sélectif	44
4.4. Extraction d'ADN avec la lysostaphine	44
4.5. Sélection d'une méthode PCR pour la détection des entérotoxines staphylococciques	45
4.6. Détection des entérotoxines staphylococciques	46
5. Conclusion et perspectives	48
6. Remerciements.....	49
7. Bibliographie	50
ANNEXES.....	52

1. Introduction

1.1. *Staphylococcus aureus* et toxi-infection alimentaire

Staphylococcus aureus est une bactérie à gram positive en forme de coques, anaérobie facultative, catalase positive et non mobile. Les cellules de forme sphérique se trouvent seules, par paire ou en amas. La température optimale de croissance de *Staphylococcus aureus* est de 37°C, cependant il peut croître dans une échelle allant de 6 à 48 °C, il a également été démontré que sous certaines conditions, ce dernier pouvait croître jusqu'à <10°C. En ce qui concerne le pH, la valeur optimale de croissance se trouve entre 7 et 7.5, il peut également croître entre des valeurs allant de 4.2 à 9.3. La croissance de *Staphylococcus aureus* est également possible à une valeur aw basse, 0.86 et jusqu'à une teneur en NaCl de 15% ^[1].

Staphylococcus aureus est ubiquitaire, il se trouve dans l'air, l'eau, la poussière, les eaux usées, le lait ainsi que dans d'autres denrées alimentaires et dans les équipements de productions. *Staphylococcus aureus* est aussi une bactérie commensale, elle se trouve sur la peau, les muqueuses et dans le nez des homéothermes (animaux à sang chaud) et des humains (20-30% de la population est porteuse). Elle possède également un pouvoir pathogène (~ 50% de la population) dû à la production de toxines, les entérotoxines staphylococciques (SEs). Ces dernières peuvent provoquer des toxi-infections alimentaires et peuvent se former dans les aliments à partir de 10⁶ ufc/g. En Suisse, selon l'Ordonnance du DFI sur l'hygiène (OHyg), la teneur maximale en micro-organismes tolérée dans les aliments est de 100 ufc/g.

Les toxi-infections alimentaires par *S. aureus* sont provoquées par l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques préformées dans l'aliment, ≤ 1 ng ^[2]. La contamination de ces derniers peut avoir lieu lors de leur manipulation par un porteur sain ou infecté ou par contact avec des installations de production insalubres. En ce qui concerne la croissance de *S. aureus*, les aliments riches en protéines et peu acides sont favorables à cette dernière, tels que les œufs, la crème, la mayonnaise... L'absence de flore compétitive, due à une étape de chauffage, peut également être favorable au développement de *S. aureus*, ce dernier n'étant pas inhibé par une flore concurrentielle. Une durée d'incubation de quelques heures à des températures entre 15 et 45 °C est nécessaire afin d'obtenir une croissance suffisante de *S. aureus*, nombre de germes, suffisant à la production de toxines. Les symptômes causés par une toxi-infection staphylococcique, déclenchés après 1 à 6 heures d'incubation, sont des crampes abdominales, des nausées, des vomissements et parfois des diarrhées. ^[3]

En Suisse, selon l'office fédéral de la santé publique (OFSP), *S. aureus* est la troisième cause de toxi-infection alimentaire après *Salmonella* et *C. jejuni*. Entre 1994 et 2006, 11 foyers de toxi-infections dues aux entérotoxines staphylococciques ont été recensées, 63.6% de ces dernières étant dues à la consommation de fromage artisanal ^[4].

Tableau 1 : Agents pathogènes et toxines mis en évidence dans les denrées alimentaires ou les selles de patients lors de toxi-infections alimentaires ^[4]

Agent causal	Année et nombre de foyers													
	94	95	96	97	98	99	00	01	02	03	04	05	06	94-06
<i>Salmonella</i> Enteritidis	12	7	7	5	6	8	2	5	2	4	5	2	0	65
<i>Salmonella enterica</i> (non Enteritidis)	3	3	1	1	0	0	1	0	2	1	0	0	1	13
<i>Salmonella</i> Typhi / Paratyphi B	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Campylobacter jejuni</i>	0	3	2	1	1*	0	3	2	5	1	0	2	3	23
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	2	3	1	2	0	0	1	0	0	0	1	11
Norovirus	0	0	0	0	1*	2	0	0	0	0	1	1	0	5
<i>Clostridium perfringens</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4
<i>Shigella sonnei</i>	2	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0	1	0	4
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	3
<i>Escherichia coli</i> (EHEC; EPEC)	0	0	0	0	1*	0	0	0	1	0	0	1	0	3
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3
Amines biogènes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Clostridium botulinum</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Clostridium difficile</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Virus de l'hépatite A	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Inconnu	10	8	8	5	3	8	5	5	4	7	6	1	0	70

* Origine du foyer: contamination fécale de l'eau de boisson, avec mise en évidence de plusieurs micro-organismes différents.

1.2. Entérotoxines staphylococciques (SEs)

Les SEs font partie de la famille des toxines pyrogéniques, ce sont de courtes protéines sécrétées dans le milieu, solubles dans l'eau et dans des conditions salines. Ces dernières sont riches en résidus de lysine, acide aspartique et glutamique, tyrosine et sont résistantes à la plupart des enzymes protéolitiques, tels que la pepsine et la trypsine. Elles sont également résistantes à la chymotrypsine, la papaïne et la rénine ainsi qu'à la chaleur ^[5]. Quelques caractéristiques biochimiques des entérotoxines sont également présentées dans le tableau 2. En plus de leur possible activité émétique, provoquant des troubles gastro-intestinaux, les SEs peuvent également agir comme superantigène, provoquant une activation de la prolifération des cellules T non spécifiques. Les entérotoxines activent la réponse immunitaire en recrutant 30% du système immunitaire, contre 1% pour un antigène, d'où son appellation de superantigène. L'activité émétique et superantigénique sont deux fonctions localisées sur des domaines séparés de la protéine, cependant il existe une forte corrélation entre ces activités ^[6].

Tableau 2 : caractéristiques majeures des entérotoxines staphylococciques ^[6]

SE type	ORF length (bp)	Precursor length (aa)	Mature SE length (aa)	Molecular mass (kDa)	pI	Reference
A	774	257	233	27,100	7.3	Betley and Mekalanos, 1985, 1988
B	801	266	239	28,336	8.6	Johns and Khan, 1988
C1	801	266	239	27,531	8.6	Bohach and Schlievert, 1987
C2	801	266	239	27,531	7.8	Bohach and Schlievert, 1989
C3	801	266	239	27,563	8.1	Hovde et al., 1990
C (bovine)				27,618	7.6	Marr et al., 1993
C (sheep)				27,517	7.6	Marr et al., 1993
C (goat)				27,600	7.0	Marr et al., 1993
D	777	258	228	26,360	7.4	Chang and Bergdoll, 1979 Bayles and Iandolo, 1989
E	774	257	230	26,425	7.0	Couch et al., 1988
G	777	258	233	27,043	5.7	Munson et al., 1998
H	726	241	218	25,210	Nd	Su and Wong, 1995
I	729	242	218	24,928	Nd	Munson et al., 1998
J	806	268	245 ²	28,565 ²	8.65 ²	Zhang et al., 1998
K	729	242	219	25,539	6.5	Orwin et al., 2001
L	723 ¹	240 ¹	215 ¹	24,593 ²	8.66 ²	Fitzgerald et al., 2001
M	722 ¹	239 ¹	217 ¹	24,842 ²	6.24 ²	Jarraud et al., 2001
N*	720 ¹	258 ¹	227 ¹	26,067 ²	6.97 ²	Jarraud et al., 2001
O*	783 ¹	260 ¹	232 ¹	26,777 ²	6.55 ²	Jarraud et al., 2001

After J.P. Rosec PhD thesis. 1999. Université de Montpellier II. Les staphylocoques entérotoxiques: étude épidémiologique de souches d'origine alimentaire et détection par PCR multiple.

*Named SEK and SEL in Jarraud et al., 2001, renamed SEM and SEO, respectively, in a correction note published in *J. Immunol.* 166: 4260 (2001).

¹Length of the mature moiety determined by the authors after Henrik Nielsen, Jacob Engelbrecht, Søren Brunak and Gunnar von Heijne: Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10: 1-6 (1997).

²Molecular weight and isoelectric point of the mature moiety determined by the authors using the software MWALC, Infobiogen. http://www.infobiogen.fr/services/analyse/cgi-bin/mwcalc_in.pl

Nd, not determined.

Actuellement, 21 types d'entérotoxines (SEA à SEV) ont été détectés, SEF n'existant pas. SEA, SEB, SEC, SED et SEE représentent les entérotoxines dites classiques, caractérisées et identifiées depuis de nombreuses années et dont l'implication dans les intoxications alimentaires a été démontrée. Pour le sérotype C (SEC), différents sous-types ont été déterminés en fonction de la différence d'activité superantigénique des entérotoxines et de l'hôte auxquelles elles sont associées (SEC1, SEC2, SEC3, SEC_{bovine}, SEC_{ovine}, SEC_{caprine} et SEC_{canine}). SEA à SEE et SEH possèdent une activité émétique. Les toxines ne possédant pas d'activité émétique ou dont cette dernière n'a pas encore été testée sont nommés « Staphylococcal Enterotoxin-like Superantigens » (Sel-Ags). Toutes ces toxines partagent également des similarités de séquence en acides aminés, certaines de ces dernières sont résumées dans le tableau 3 ^[6].

Tableau 3 : pourcentage des acides aminés identifiés dans différentes entérotoxines staphylococciques ^[6]

Toxin	SEA	SEB	SEC1	SED	SEE	SEG	SEH	SEI	SEJ	SEM	SEN	SEO
SEA	100	33	30	50	83	27	37	39	64	35	39	37
SEB		100	68	35	32	43	33	31	33	29	32	36
SEC1			100	31	29	41	27	26	30	26	29	33
SED				100	52	27	35	33	51	41	38	39
SEE					100	27	35	35	63	37	39	37
SEG						100	34	28	29	28	31	30
SEH							100	33	35	38	34	31
SEI								100	34	31	31	57
SEJ									100	38	42	33
SEM										100	28	31
SEN											100	42
SEO												100

After Jarraud et al., 2001. Names were corrected by the authors after the correction note published in *J. Immunol.* 166: 4260. Amino acid sequences of the precursors were compared using Blast2 sequence method (open gap of 11 and extension gap penalties of 1).

1.2.1. Localisation et régulation des gènes d'entérotoxines staphylococciques

En ce qui concerne les gènes codants les entérotoxines staphylococciques, ces derniers peuvent avoir différents supports génétiques, la plupart d'entre eux sont des éléments génétiques mobiles (tableau 4). Ces derniers peuvent être des plasmides (SEB, SED, SEJ, SER, SES et SET), des phages (tempéré pour SEA ou défectif pour SEE) ainsi que par des îlots génomiques (SEB, SEC, SEG, SEH, SEI, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP et SEQ). L'existence d'un opéron *egc* (enterotoxin gene cluster) a également été mis en évidence, ce dernier codant pour différentes SEs, tel que SEG, SEI, SEM, SEN et SEO ^[7].

Tableau 4 : support génétique de certaines entérotoxines staphylococciques ^[6]

Gene	Genetic location	Reference
sea	prophage	Betley and Mekalanos, 1985; Borst and Betley, 1994
seb	chromosome, plasmid, transposon	Shafer and Iandolo, 1978 Shalita et al., 1977; Altboum et al., 1985
sec1	Plasmid	Altboum et al., 1985
sec _{bov}	pathogenicity island	Fitzgerald et al., 2001
sed	plasmid (pIB485)	Bayles and Iandolo, 1989
see	defective phage	Couch et al., 1988
seg	<i>Enterotoxin gene cluster (egc)</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
sei	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
sej	plasmid (pIB485)	Zhang et al., 1998
sek	pathogenicity island	Orwin et al., 2001
sel	pathogenicity island	Fitzgerald et al., 2001
sem	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
sen*	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
seo*	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001

*Renamed after the correction note published in *J. Immunol.* 166: 4260 (2001).

La régulation des gènes de SEs est effectuée par un réseau complexe de différents régulateurs interagissant entre eux. Cependant, le principal système de régulation de *S. aureus*, contrôlant l'expression du gène des facteurs de virulence, est le régulateur de gènes accessoire, *agr* (accessory gene regulator), agissant en combinaison avec le système de régulateur de gènes staphylococciques, *sar* (staphylococcal accessory regulator). Les gènes des entérotoxines SEB, SEC et SED ont été identifiés comme dépendants du système de régulation *agr* et SEA et SEJ comme indépendants. La production des entérotoxines contrôlée par le système *agr* dépend de la capacité de *S. aureus* à atteindre une densité cellulaire importante lors de la croissance ^[5].

1.2.2. Détection des entérotoxines staphylococciques

Actuellement, la détection des entérotoxines staphylococciques dites classiques (SEA à SEE) est principalement effectuée à l'aide de méthodes immuno-enzymatiques, tels que les tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) et RPLA (reversed passive latex agglutination).

La méthode RPLA utilise des anticorps spécifiques anti-entérotoxines liés à des billes de latex, la présence d'entérotoxines dans l'échantillon à analyser provoque l'agglutination entre les billes de latex. La sensibilité de cette méthode est de 1ng /g et le résultat obtenu est visible à l'œil nu. En ce qui concerne le test ELISA, ce dernier permet de détecter, en plus des entérotoxines classiques, SEH, SEG et SEI. Ce test est basé sur la formation d'un éventuel complexe anticorps-antigènes, si présence d'entérotoxines staphylococciques ^[7].

Les méthodes citées précédemment permettent de détecter les entérotoxines staphylococciques formées dans un milieu de culture ou une matrice alimentaire. En ce qui concerne la détection des gènes codants pour les entérotoxines, cette dernière peut être effectuée à l'aide de la méthode PCR ^[5].

1.3. Méthodes PCR (Polymerase Chain Reaction)

1.3.1. PCR classique

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode permettant l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN. La réaction PCR nécessite 2 amorces oligonucléotidiques entourant la séquence cible d'ADN devant être répliquée, chacune étant complémentaire à un des deux brins d'ADN. Les amorces sont généralement ajoutées en excès par rapport à la quantité d'ADN à amplifier dans le mélange réactionnel. Ce dernier est également composé de l'ADN polymérase, de dNTPs (désoxyribonucléotides triphosphate), de sels ($MgCl_2$, KCl), d'un tampon et de l'échantillon d'ADN. La réaction PCR peut aussi être optimisée par l'utilisation de nombreux additifs, tels que la bétaine, le DMSO (diméthyl sulfoxyde), le BSA (bovine serum albumine), la formamide, le glycérol et le chlorure de magnésium, etc. Cependant, ces derniers peuvent également inhiber la réaction PCR, en fonction de la concentration à laquelle ils sont ajoutés ^[8]. D'autres inhibiteurs de la PCR sont également connus, tels que des fluides corporels ou des réactifs utilisés en médecine (hémoglobine, héparine, urine...), des constituants alimentaires (composés phénoliques ou organiques, glycogène, graisse, ions calcium...) ou environnementaux (composés phénoliques, métaux lourds, milieu de culture, les détergents ioniques, etc.) ^[10]. Ces derniers inhibent la réaction PCR en interférant avec l'amplification, ils se lient directement avec l'ADN ou avec l'ADN polymérase.

La PCR est effectuée à l'aide d'une suite de cycles, comportant trois étapes chacun, la dénaturation, l'hybridation et l'extension (figure 1). La première étape consiste à dénaturer l'ADN double brin en ADN simple brin à l'aide de la chaleur, 94°C. Lors de la deuxième étape, le mélange réactionnel est refroidi à 45-60°C, chacune des amorces reconnaît et se lie à sa séquence complémentaire. Les amorces sont positionnées de manière à ce que leur extrémité 3' soit face à face afin que la synthèse d'ADN ait lieu dans la région se trouvant entre les deux amorces. Lors de la dernière étape, l'ADN polymérase se lie à l'extrémité 3' de chaque amorce liée et utilise le dNTPs afin de pouvoir synthétiser un nouveau brin d'ADN dans la direction 5' à 3'. Lors de cette étape, l'ADN polymérase possède une température optimale pour la répllication d'ADN de 72°C.

Après un cycle de la répllication PCR, une nouvelle copie de chaque brin d'ADN produit est synthétisée et le nombre de cycle peut varier entre 20 et 40. Le nombre de brins d'ADN répliqués lors de la PCR peut être estimé théoriquement jusqu'à l'application de 30 cycles, il est égal à 2^n (n = nombre de cycle) ^[11]. Une fois la PCR terminée, les résultats peuvent être interprétés, par exemple par une électrophorèse sur gel d'agarose.

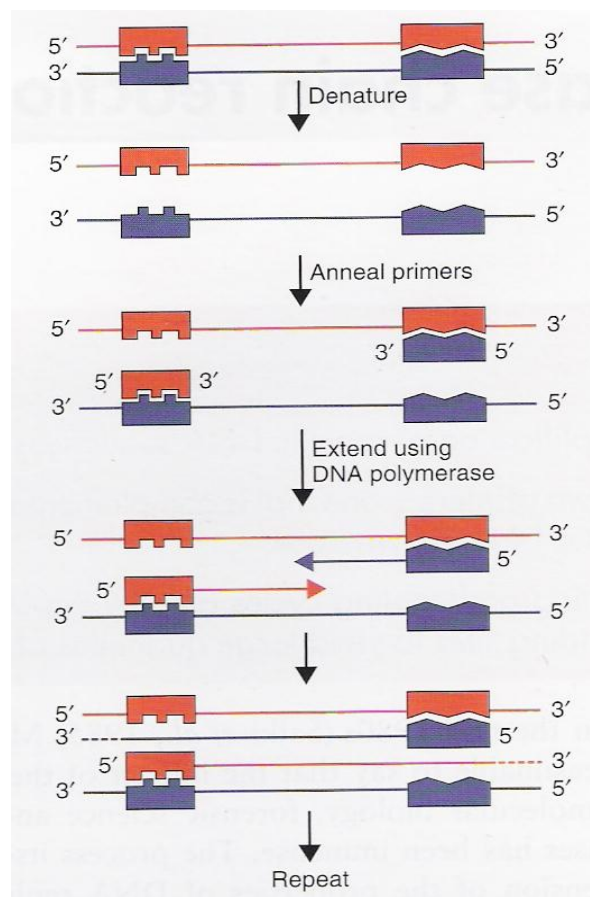


Figure 1 : réaction PCR ^[11]

2.3.1.1. Détection des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet la séparation de fragments d'ADN de différentes tailles (200-15'000 pb). Le gel d'agarose est un réseau complexe de polymère, composé d'agarose et d'un tampon aqueux. La taille des pores est déterminée par la composition de ce dernier et par la concentration et le type d'agarose utilisé. Plus les pores du gel sont grands, plus la taille des molécules que le gel peut séparer est grande. Les fragments d'ADN sont séparés par migration sur gel d'agarose à l'aide d'un champ électrique constant. L'ADN qui est chargé négativement migre à travers le gel en direction de l'électrode positive. D'une manière générale, les petits fragments d'ADN migrent plus vite que les grands.

L'ajout de bromure d'éthidium au gel d'agarose permet de voir apparaître les fragments d'ADN sur le gel. En effet, le bromure d'éthidium est capable de s'intercaler entre les paires de bases empilées de l'ADN et permet, lors de l'illumination sous lumière UV du gel d'agarose, l'apparition de l'ADN sur le gel comme une bande de fluorescence ^[11].

1.3.2. PCR en temps réel

La PCR en temps réel utilise le même principe de fonctionnement que la PCR classique, amplification cyclique d'un fragment d'ADN. Cependant, lors de cette méthode, la réplique de l'ADN est mesurée tout au long de la réaction et non à la fin.

Lors de la PCR en temps réel, la détection et la quantification de l'ADN est effectuée à l'aide d'un marqueur fluorescent. Ce dernier peut être un agent se liant à l'ADN double brin, par exemple SYBR Green ou une sonde fluorescente, tel que Taqman. L'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits lors de la réaction PCR et est mesurée à la fin de chaque cycle. Les échantillons sont analysés dans leur phase exponentielle d'amplification, phase la plus reproductible de la réaction ^[11].

1.3.3. La multiplex PCR

La multiplex PCR a les mêmes principes de base que la PCR classique, cependant elle permet l'amplification de différentes séquences d'ADN cibles en une seule réaction. Les couples d'amorces correspondant aux différentes séquences à amplifier sont introduites dans le même tube réactionnel avec les autres éléments nécessaires à la réaction PCR. Cependant, la mise au point de cette dernière est plus difficile que pour une PCR classique, étant donné le nombre d'amorces et de réactifs utilisés pour l'amplification des différentes séquences d'ADN ^[12]. La lecture des résultats est effectuée de la même manière que pour la PCR classique. La multiplex PCR peut également être effectuée en temps réel, selon les mêmes conditions que la PCR en temps réel classique, chaque produit étant couplé à un fluorochrome de couleur d'émission différente.

Cette méthode permet également de réduire le coût et le temps d'analyse ainsi que la quantité d'ADN nécessaire à la réaction PCR.

1.4. Objectifs

Ce travail de diplôme se déroule dans la continuité du projet « Staphtox » ^[13], effectué en 2009-2010, dans le but de déterminer une méthode PCR quantitative rapide permettant de détecter simultanément les gènes des 21 toxines connues de *Staphylococcus aureus*. L'analyse des gènes a été effectuée à l'aide d'une multiplex PCR en temps réel et à l'aide du marqueur fluorescent SYBR Green, cependant cette dernière a échoué par manque de spécificité. L'analyse des produits PCR a également été effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette méthode a permis de différencier les souches contenant les entérotoxines staphylococciques des autres souches microbiennes (non *S. aureus*), cependant cette dernière n'a pas permis d'obtenir de résultats précis et nécessite d'être optimisée.

L'objectif principal de ce travail de diplôme consiste en la détermination et l'optimisation d'une méthode PCR permettant la détection des gènes des 21 toxines de *S. aureus* dans une matrice alimentaire en une seule réaction. En fonction des résultats obtenus pour le projet « Staphtox », la real-time PCR est abandonnée au profit d'une PCR avec analyse des produits par électrophorèse sur gel d'agarose. La croissance des souches et l'extraction de l'ADN de ces dernières, étapes effectuées précédemment à l'analyse PCR, sont également optimisées afin d'améliorer la spécificité de cette dernière.

Dans un premier temps, il s'agit de déterminer un milieu d'enrichissement sélectif et optimal à la croissance de *S. aureus* parmi différents milieux nutritifs sélectionnés à l'aide de la littérature et à l'aide de différentes souches bactériennes (*S. aureus*, *S. non aureus* et non *S. aureus*). L'utilisation du milieu doit permettre une inhibition de la croissance des souches non *S. aureus* et *S. non aureus* ainsi qu'un développement optimal à *S. aureus*.

Dans un deuxième temps, la méthode d'extraction d'ADN des souches est à optimiser à l'aide de lysostaphine. L'utilisation de cette dernière doit permettre d'augmenter la spécificité de la méthode d'extraction aux Staphylocoques.

Dans un troisième temps, la méthode PCR doit être déterminée. Cette dernière doit permettre de différencier les souches de *Staphylococcus* produisant des toxines aux autres souches bactériennes dans une matrice alimentaire.

Le développement d'une telle méthode est effectué dans le but de pouvoir détecter les gènes codants des toxines de *Staphylococcus* pendant la production de la denrée alimentaire et ceci avant la production de toxines. La mise en évidence de *Staphylococcus* produisant des toxines permet d'indiquer un risque potentiel de contamination de la denrée alimentaire et peut entrer dans le cadre de la sécurité alimentaire.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Souches

Les différentes souches de bactéries utilisées lors de ce travail de diplôme sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Souches utilisées lors du travail de diplôme

Souche	Référence	Source
<i>S. aureus</i>	A900322	Lyon
<i>S. aureus</i>	A900624	Lyon
<i>S. aureus</i>	CCM5757	Lyon
<i>S. aureus</i>	FRI1151m	Lyon
<i>S. aureus</i>	FRI137	Lyon
<i>S. aureus</i>	FRI913	Lyon
<i>S. aureus</i>	Fukuoka 5	Lyon
<i>S. aureus</i>	DSM1104	HES·SO Sion
<i>S. aureus</i>	DSM799	HES·SO Sion
<i>S. capitis</i> spp.	CCM2734	Lyon
<i>S. epidermidis</i>	DSM20044	HES·SO Sion
<i>S. haemolyticus</i>	CCM2737	Lyon
<i>S. saprophyticus</i> spp.	CCM883	Lyon
<i>S. warneri</i>	CCM2730	Lyon
<i>E. coli</i>	DSM787	HES·SO Sion
<i>S. typhimurium</i>	ATC13311	HES·SO Sion
<i>L. monocytogenes</i>	DSM 20600	HES·SO Sion
<i>B. cereus</i>	DSM31	HES·SO Sion
<i>E. faecalis</i>	DSM20478	HES·SO Sion
<i>P. aeruginosa</i>	DSM939	HES·SO Sion
<i>L. casei</i>	-	HES·SO Sion
<i>L. plantarum</i>	DSM20174	HES·SO Sion

2.1.2. Milieux, réactifs et produits

Les différents milieux et produits utilisés pour la croissance des souches bactériennes et leur dénombrement (analyses microbiologiques) sont répertoriés dans le tableau 6. Ces derniers ont été préparés selon les indications des fournisseurs et stockés selon les directives du laboratoire de la HES·SO.

Tableau 6 : Milieux et produits utilisés lors des analyses microbiologiques

Milieu et produit	Référence	Fournisseur
- PCA (Plate Count Agar)	4021452	Biolife (Italy)
- Peptone (Tryptic Digest of Casein)	4123402	Biolife (Italy)
- Beef Extract Powder	4111252	Biolife (Italy)
- D-Lactose monohydrate	61345	Fluka
- Chlorure de Sodium	3134-1KG-R	SIGMA-ALDRICH (Germany)
- Agar	4110302	Biolife (Italy)
- TSB (Tryptic Soy Broth)	4021552	Biolife (Italy)
- TBX Agar (Tryptone Bile Glucuronid Agar)	CM0945	OXOID LTD (UK)
- ALOA (Agar Listeria selon Ottaviani et Agosti)	43641	bioMérieux
- MYP Agar (Agar Cereus Sélectif)	4011112	Biolife (Italy)
- Polymyxin B-Sulfat (<i>B. cereus</i> selective supplement)	1.09875.0010	Merck
- XLD (Xylose Lysin Desoxycholat Agar)	CM0469	OXOID LTD (UK)
- m-ENTEROCOCCUS Agar	4020462	Biolife (Italy)
- BP (Baird & Parker)	4011162	Biolife (Italy)
- Egg Yolk Emulsion 50% (supplement BP)	42111601	Biolife (Italy)
- Tellurite de potassium 10%	5164	Merck
- Crème à la vanille	Migros Classic	Estavayer Lait SA (Suisse)

Les différents produits et réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN et les analyses PCR (biologie moléculaire) se trouvent dans le tableau 7.

Tableau 7 : Réactifs et produits utilisés lors des analyses de biologie moléculaire

Réactifs et produits	Référence	Fournisseur
- NucleoSpin®Tissue Kit	740952.50	MACHEREY- NAGEL GmbH & Co. KG
- EDTA disodium salt dihydrate	A2937, 0250	AppliChem
- Tris hydrochloride	A3452, 0500	AppliChem
- Triton® X-100	23,472-9	Sigma-Aldrich
- Lysostaphin recombinans	L9043	Merck
- RNase	203203	QIAGEN
- Ethanol absolu	-	HES·SO Sion
- Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Q32850	invitrogen
- Agarose LE	AGR-LE-500	Axygen Biosciences
- Tampon TBE	-	HES·SO Sion
- Bromure d'éthidium	E1510	Sigma-Aldrich
- Tampon de charge BBP (bleu de bromophénol)	-	HES·SO Sion
- Tampon de charge XC (xylène cyanol)	-	HES·SO Sion
- 2×KAPA 2G Fast Ready Mix	KK5101	KAPABIOSYSTEMS
- Amorce (100 µM)	*	Microsynth
- 100% DMSO	F515	FINNZYMES
- Deoxynucleotide Solution Mix (10mM)	N0447S	New England Biolabs
- Hot Start II DNA polymerase	F-122S	FINNZYMES
- Rotor Gene Probe PCR Kit	204372	Qiagen
- MgCl ₂ Solution (25mM)	N04126	Applied Biosystems
- Bétaine	B2629	Sigma-Aldrich

* Les références exactes des différentes amorces utilisées se trouvent en annexe 1

2.1.3. Equipement et appareillage

Les différents équipements et appareils utilisés lors du travail de diplôme pour les analyses de microbiologie se trouvent dans le tableau 8.

Tableau 8 : Equipements et appareils utilisés lors des analyses microbiologiques

Matériel	Type	Fournisseur
- Etuves ventilées (30°C, 37°C, 44°C)	D06062	Memmert GmbH & Co. KG
- Bain-marie avec agitation	Telemodul 40 S	Variomag
- Autoclave	HICLIVE™ HV-85	HMC
- Four micro-onde	FM 1300 CA	FRANKE AG
- Mélangeur mécanique	Stomacher 400 Circulator	Seward
- Sac sans filtre avec fermeture	Stomacher lab system 400	Seward
- Microscope	BX 40	Olympus Optical Co. LTD
- Chambre de comptage (0,0025 mm ² , épaisseur : 0.02 mm)	Neubauer Improved	Assistent
- Vortex	Genie 2™	Bender & Hobein AG
- Balance	PM 4800	METTLER
- Matériel standard de laboratoire	-	HES·SO Sion

Les différents équipements et appareils utilisés pour le bon déroulement du travail, analyses de biologie moléculaire, sont cités dans le tableau 9.

Tableau 9 : Equipements et appareils utilisés lors des analyses de biologie moléculaire

Matériel	Type	Fournisseur
- centrifugeuse	MIKRO 200	Hettich ZENTRIFUGEN
- Bloc chauffant	Thermomixer comfort	eppendorf
- Qubit™ Quantification	Qubit®Fluorometer	invitrogen
- Appareil d'électrophorèse	PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories
- Système d'analyse d'image	ChemiDoc XRS	Bio-Rad Laboratories
- Thermocycler	T3 Biometra	biolabo scientific instruments
- qPCR thermocycler	Rotor-Gene Q	Qiagen
- Matériel standard de laboratoire	-	HES·SO Sion

2.2. Méthodes

2.2.1. Revitalisation des souches

Les souches pures se trouvant stockées dans du glycérol à -18°C sont revitalisées sur milieu PCA (*S. aureus* et *S. non aureus*) / MRS (*L. casei*). Ces dernières sont décongelées rapidement dans la main, puis 50 µl sontensemencés en surface. Les souches sont mises à incuber 24h à 37°C en milieu aérobie.

Les souches pures se trouvant sur milieu PCA et stockées à 2°C sont également revitalisées sur milieu PCA (*E.coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *E. faecalis*, *B.cereus*) / MRS (*L. plantarum*). Une colonie estensemencée en surface, puis les souches sont mises à incuber 24h à 37°C.

Les souches revitalisées sont stockées à 2°C et sont prêtes pour utilisation.

2.2.2. Sélection du milieu d'enrichissement sélectif pour *Staphylococcus aureus*

Le choix d'un milieu sélectif et optimal à la croissance de *staphylococcus aureus* a été effectué uniquement à l'aide de quelques souches se trouvant dans le tableau 5, *S. aureus* FRI137 et CCM5757, *S. capitis*, *E.coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus*, *E. faecalis* et *L. monocytogenes*, ainsi qu'en présence d'une matrice alimentaire, la crème dessert à la vanille (cf. annexe 2).

Préparation des souches

Une colonie de chaque souche est inoculée dans un tube à essai contenant 5 ml de bouillon nutritif (Tryptic Soy Broth), préalablement mis à l'étuve à 37°C, puis ces derniers sont mis à incuber pendant 24h à 37°C.

Après incubation, le nombre de germes des souches est déterminé. L'échantillon est dilué 20 fois puis le nombre de micro-organismes est dénombré à l'aide d'une chambre de comptage. Une fois ce dernier déterminé, les échantillons sont dilués avec de l'eau physiologique afin d'obtenir une concentration d' ~25'000 ufc/ml, soit 1000 ufc/g d'aliment pour 25 g, pour chaque souche de bactéries.

Croissance des souches dans le milieu sélectif

La croissance de chacune des souches de *S. aureus* et *S. non aureus* est effectuée en présence des autres souches (*E.coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *E. faecalis*, *B.cereus*) ainsi que de la matrice alimentaire (10%) et du milieu sélectif (90%).

La composition des deux bouillons d'enrichissement sélectifs à la croissance de *Staphylococcus aureus* utilisés, Buttiaux & Brogniart hypersalé et Tryptic Soy Broth + 10% NaCl, se trouve dans les tableaux 10 et 11.

Tableau 10 : composition du milieu Buttiaux et Brogniart hypersalé

Ingrédient	Quantité
Tryptone	20 g
Extrait de viande de bœuf	6 g
Lactose	15 g
Chlorure de sodium	150 g
Agar	1 g
Eau déminéralisée	1000 ml

Tableau 11 : composition du milieu TSB + 10% NaCl

Ingrédient	Quantité
Tryptic Soy Broth	30 g
Chlorure de sodium	100 g
Eau déminéralisée	1000 ml

25 g d'aliment sont ajoutés à 225 ml de bouillon d'enrichissement sélectif (Buttiaux & Brogniart ou Tryptic Soy Broth + 10% NaCl) puis 1 ml (25'000 ufc) de chaque souche nécessaire y est inoculé. Ces derniers sont ensuite mélangés et le nombre de germes initial est déterminé sur milieux spécifiques aux différentes bactéries inoculées. Le mélange est ensuite mis à incuber pendant 24h à 37°C.

Après incubation, le nombre de germes final est déterminé de la même manière que le nombre initial.

Dénombrement des germes

La détermination du nombre de germes initial et final en ufc/g été effectué à l'aide de la méthode d'ensemencement en surface et dans la masse. En fonction du nombre de germes initial ou final à déterminés, différentes dilutions décimales ont étéensemencées. En ce qui concerne le nombre initial de germes, les dilutions -2 et -3 ont étéensemencées pour chacune des souches. Pour le nombre final, les dilutions appliquées se trouvent dans le tableau 12.

Tableau 12 : Dilutions décimalesensemencées afin de déterminer le nombre de germes final

Souche	Dilution	Méthode d'ensemencement
<i>S. aureus</i> et <i>S. non aureus</i>	-8, -9 et -10	en surface
<i>E. coli</i>	-1, -2 et -3	dans la masse
<i>S. typhimurium</i> , <i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. faecalis</i>	-2 et -3	en surface

Les différents milieux sélectifs utilisés ainsi que leur condition d'incubation en fonction des différentes souches choisies se trouvent dans le tableau 13.

Tableau 13 : Milieu de culture et conditions d'incubations des souches utilisées

Souche	Milieu	Incubation
<i>S. aureus</i>	BP	37 ± 1 °C / 18-48 heures
<i>S. non aureus</i>	BP	37 ± 1 °C / 18-48 heures
<i>E. coli</i>	TBX	44 ± 1 °C / 18-24 heures
<i>S. typhimurium</i>	XLD	37 ± 1 °C / 24 ± 3 heures
<i>L. monocytogenes</i>	ALOA	37 ± 1 °C / 2-3 jours
<i>B. cereus</i>	MYP-agar	30 ± 1 °C / 18-48 heures
<i>E. faecalis</i>	m-ENT	37 ± 1 °C / 2 jours

2.2.3. Croissance des souches dans le milieu d'enrichissement sélectif

La croissance de la totalité des souches se trouvant dans le tableau 5 a été effectuée dans le milieu d'enrichissement sélectif avec la denrée alimentaire. La croissance de quelques souches a également été effectuée sans matrice alimentaire, *S. aureus* FRI137, FRI913, CCM5757 et DSM799, *S. haemolyticus* et *capitis* ainsi que *E. faecalis* (cf. annexe 3).

Préparation des souches

La préparation des souches est effectuée de la même manière que celle décrite au point 2.2.2., Sélection du milieu d'enrichissement pour *S. aureus*. Cependant, certaines modifications sont apportées dans les dilutions effectuées. Après détermination du nombre de germes des échantillons par chambre de comptage, ces derniers sont dilués afin d'obtenir une concentration finale d' ~5'000-10'000 ufc/g d'aliment ou ml.

Croissances des souches dans le milieu sélectif

La croissance individuelle de chaque souche dans le milieu sélectif, avec ou sans matrice alimentaire, est effectuée dans 9 ml de bouillon d'enrichissement sélectif Tryptic Soy Broth + 15 % NaCl. En ce qui concerne la croissance des souches avec la matrice alimentaire, 1 g de cette dernière est ajouté au bouillon. La souche y est ensuite ajoutée, afin d'obtenir une concentration finale d'environ 5'000 à 10'000 ufc/g. Pour la croissance des souches sans denrée alimentaire, 1 ml d'une solution bactérienne de 5'000 à 10'000 ufc/ ml y est ajouté. Le mélange est ensuite mis à incuber pendant 24h à 37°C.

Le nombre de germes initial est déterminé à l'aide de milieux spécifiques pour les bactéries inoculées dans la matrice alimentaire. En ce qui concerne les bactéries se trouvant uniquement en présence du milieu sélectif, le nombre de germes est déterminé sur milieu PCA.

Après incubation, le nombre de germes final est déterminé de la même manière que le nombre initial.

Détermination du nombre de germes

Le dénombrement des germes en ufc/g ou ml a été effectué à l'aide de la méthode d'ensemencement dans la masse et en surface. Les différents milieux sélectifs utilisés ainsi que leur condition d'incubation en fonction des différentes souches choisies sont identiques à ceux mentionnés dans le tableau 13, chapitre 2.2.2. Cependant, deux bactéries ont été ajoutées, *L. casei* et *L. plantarum*. Ces dernières ont été ensemencées en surface sur milieu MRS-agar et incubées 3 jours à 37 ± 1 °C. Les dilutions décimales ensemencées pour déterminer le nombre de germes initial sont -2 et -3. En ce qui concerne le nombre de germes final, les dilutions ensemencées sont -2, -3, -4, -5, -7 et -8. Lors du dénombrement des bactéries à l'aide de milieu PCA, les conditions d'incubation restent identiques.

2.2.4. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique a été effectuée sur l'intégralité des souches bactériennes mises en croissance, dans le milieu nutritif général TSB, dans le bouillon d'enrichissement sélectif ainsi que dans ce dernier avec présence de la matrice alimentaire, lors des essais du chapitre 2.2.3.

L'extraction a été réalisée de la même manière que dans le projet « Staphtox ». Lors de ce dernier, l'extraction d'ADN a été effectuée à l'aide d'un kit d'extraction NucleoSpin® Tissue. Ce dernier a été utilisé pour extraire l'ADN de différentes souches pures de bactéries et a été adapté afin d'optimiser l'extraction de *Staphylococcus aureus*. Cette optimisation a été effectuée par l'utilisation de lysostaphine, la concentration (U) nécessaire a été déterminée lors de ce projet précédents, cette étape permet d'augmenter la spécificité de la méthode d'extraction. Les temps d'incubation lors des étapes de pré-lyse et de lyse ont également été déterminés afin que les étapes d'extractions soient optimales. Lors de ce travail, l'extraction d'ADN a été effectuée de la même manière que lors du projet « Staphtox ».

L'extraction d'ADN a été effectuée selon le protocole de base pour les bactéries, cependant les modifications suivantes y ont été apportées. Après centrifugation de 0.5 ml de culture bactérienne, le pellet est lavé avec 1 ml de tampon TE (dans le Kit) puis ce dernier est resuspendu à l'aide de buffer T1 (180µl) mélangé à de la lysostaphine (5U) et les échantillons sont mis à incuber 1 heure à 37°C. Ensuite, 25µl de protéinase K (dans le kit) y sont ajoutés et ces derniers sont incubés 3heures à 56°C. Les échantillons sont ensuite mis à incuber 5 minutes à température ambiante

avec 20 µl de RNase (20mg/ml). L'extraction d'ADN est finalement terminée en concordance avec le protocole du fournisseur, se trouvant à l'annexe 4, à partir de l'étape 3. Les échantillons d'ADN une fois extraits sont quantifiés puis stockés à -20°C.

2.2.5. Analyse qualitative de l'ADN extrait

La qualité de l'ADN extrait est contrôlée à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose (1.75%). Ce dernier est fabriqué à l'aide de 100 ml de tampon TBE 1x et de 1.75 g d'agarose ajouté à un erlenmeyer de 500 ml. Le mélange est ensuite mis au four à micro-onde et amené à ébullition jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Le mélange est ensuite mis à refroidir sous faible agitation jusqu'à ~ 60°C, puis 2 µl de bromure d'éthidium y est ajouté. Après quelques instants d'agitation, le gel est coulé dans la forme avec le peigne approprié puis laissé solidifier ~ 30 minutes à température ambiante. Ce dernier est ensuite déposé dans une cuve d'électrophorèse et recouvert de tampon d'électrophorèse, TBE 1x.

Les échantillons peuvent ensuite être chargés sur le gel. 20 µl d'ADN extrait sont mélangés avec 4 µl de tampon de charge, le bleu de bromophénol, puis déposés dans les puits du gel. 5 µl d'un marqueur de taille (1 kb) sont également déposés sur le gel.

La migration est effectuée à 120 V pendant 40 minutes, une fois cette dernière terminée, la lecture du gel est effectuée sur lampe UV.

2.2.6. Analyse quantitative de l'ADN extrait

La quantification de l'ADN génomique extrait est effectuée à l'aide du protocole Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kits (schématisé en annexe 5) et du Qubit™ fluorometer. A l'aide de cet appareil, l'ADN double brin peut être quantifié, les résultats obtenus sont en µg/ml. Avant chaque utilisation, ce dernier nécessite d'être calibré et les solutions utilisées doivent se trouver à température ambiante.

2.2.7. Sélection de la méthode PCR pour l'identification des gènes de toxines de *S. aureus*

2.2.7.1. Choix de l'enzyme et des conditions de cycles pour les réactions PCR

La sélection de l'enzyme la plus appropriée aux essais PCR a été effectuée à l'aide de deux enzymes, 2x KAPA 2G Fast Ready Mix et Phire® Hot Start II DNA Polymerase. Les essais ont été réalisés uniquement avec quelques échantillons d'ADN extraits, *S. aureus* FRI913 et CCM5757 ainsi que *E. faecalis* mis en croissance dans un milieu nutritif général (TSB) ainsi que dans le milieu d'enrichissement sélectif (TSB + 10% NaCl) avec la matrice alimentaire. Des plasmides contenant les gènes isolés de certaines toxines de *S. aureus* sont employés comme contrôle positif de la réaction PCR, toxines E, k, L et Q. Des contrôles négatifs sont également employés lors de chaque analyse PCR, le contrôle de l'extraction d'ADN et le contrôle de l'eau PCR.

Préparation du master mix

Pour chacune des deux enzymes, un master mix est préparé selon les tableaux 14 et 15, puis réparti dans des tubes PCR. Les échantillons d'ADN sont ensuite ajoutés et la PCR peut avoir lieu. La préparation des master mix a été effectuée au plus proche des instructions du fournisseur, cependant quelques modifications y ont été apportées.

Tableau 14 : master mix utilisé pour la PCR avec enzyme 2x KAPA 2G Fast Ready Mix

Produit / réactif	Quantité [µl] dans 25 µl rxn	Concentration finale
- 2x KAPA 2G Fast Ready Mix	12.5	1 x
- Mélange amorces (2 µM)	2.5	0.2 µM
- DMSO (100%)	1.25	0.05
- Echantillon ADN	-*	~ 10 ng
- Eau PCR	jusqu'à 25 µl	-

Tableau 15 : master mix utilisé pour la PCR avec enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase

Produit / réactif	Quantité [µl] dans 20 µl rxn	Concentration finale
- Eau PCR	jusqu'à 20 µl	-
- 5x Phire® Reaction buffer	4	1x
- dNTPs (10 mM)	0.4	200 µM
- Mélange amorces (2 µM)	2	0.2 µM
- DMSO (100%)	0.6	0.03
- Echantillon ADN	- *	~ 10 ng
- Phire® Hot Start II DNA Polymerase	0.4	-

* La quantité d'ADN est déterminée en fonction de la concentration de l'échantillon d'ADN analysé

Le mélange d'amorces est effectué à l'aide de 49 amorces pour un volume final de 250 µl. 5 µl de chacune des amorces sont mélangés et le volume final est ajusté à l'aide de 5 µl de tampon TE. La concentration maximale du mélange d'amorce pouvant être atteint est de 2 µM. Les différentes amorces utilisées se trouvent en annexe 1 et ont été sélectionnées en fonction des toxines à analyser (SEA à SEV), annexe 6, et du projet « Staphtox ».

Afin d'éviter les contaminations, la préparation du master mix et l'ajout de l'échantillon d'ADN n'ont pas lieu au même endroit.

Lors de la préparation des échantillons contenant les plasmides, ces derniers sont dilués 1000x et 2 µl sont utilisés pour les analyses PCR.

Cycles PCR

Les conditions de cycles pour les analyses PCR ont été fixées et modifiées en fonction des indications du fournisseur.

Tableau 16 : conditions de cycles pour la PCR avec enzyme 2x KAPA 2G Fast Ready Mix

Etape du cycle	Temps	Température
- Dénaturation initiale	3 min	95°C
- Dénaturation	15 sec	95°C
- Hybridation	15 sec	60°C
- Extension	10 sec	72°C
Nombre de cycles	35	-
- Extension finale	1 min	72°C

Tableau 17 : conditions de cycles pour la PCR avec enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase

Etape du cycle	Temps	Température
- Dénaturation initiale	3 min	98°C
- Dénaturation	5 sec	98°C
- Hybridation	5 sec	61°C
- Extension	1 / 15 sec *	72°C
Nombre de cycles	35	-
- Extension finale	1 min	72°C

* Avec l'enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase, deux conditions d'extension ont été appliquées

2.2.7.2. Optimisation de la méthode PCR

Une fois l'enzyme (Phire® Hot Start II DNA Polymerase) et les conditions de cycle déterminées, la méthode PCR est optimisée. La méthode de base déterminée correspond aux paramètres se

trouvant dans le tableau 18 pour la préparation du master mix et dans le tableau 19 pour les conditions de cycle. Les échantillons utilisés pour ces différents essais sont semblables à ceux employés lors du chapitre 2.2.7.1., choix de l'enzyme et des conditions de cycles pour les réactions PCR, cependant deux échantillons d'ADN sont ajoutés, *L. plantarum* et *S. capitis* ayant crû avec le milieu sélectif et la denrée alimentaire.

Tableau 18 : master mix déterminé pour la PCR avec enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase

Produit / réactif	Quantité [µl] dans 20 µl rxn	Concentration finale
- 5x Phire® Reaction buffer	4	1×
- dNTPs (10 mM)	0.4	200 µM
- Mélange amorces (2 µM)	2	0.2 µM
- DMSO (100%)	0.6	0.03
- Echantillon ADN	12.6*	~ 10 ng
- Phire® Hot Start II DNA Polymerase	0.4	-

*Quantité calculée afin d'avoir une concentration moyenne d'ADN de 10 ng pour les souches de *S. aureus*

Tableau 19 : conditions de cycles pour la PCR déterminé pour la PCR avec enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase

Etape du cycle	Temps	Température
- Dénaturation initiale	3 min	98°C
- Dénaturation	5 sec	98°C
- Hybridation	5 sec	61°C
- Extension	1 sec	72°C
Nombre de cycles	35	-
- Extension finale	1 min	72°C

L'optimisation est effectuée en modifiant différents paramètres de la composition du master mix (utilisation d'additif) et des conditions de cycle.

En ce qui concerne le master mix, les essais d'optimisation ont été effectués par l'utilisation de la bétaine et la suppression du DMSO dans la composition de la réaction PCR, figure 18. Cette dernière se trouve pour chacun des essais dans les tableaux 20 et 21. Lors de ces derniers, les conditions de cycle restent fixes (cf. tableau 19).

Tableau 20 : essai sans utilisation de DMSO

Produit / réactif	Quantité [µl] dans 20 µl rxn	Concentration finale
- Eau PCR	0.6	-
- 5x Phire® Reaction buffer	4	1×
- dNTPs (10 mM)	0.4	200 µM
- Mélange amorces (2 µM)	2	0.2 µM
- Echantillon ADN	12.6	~ 10 ng
- Phire® Hot Start II DNA Polymerase	0.4	-

Tableau 21 : essai avec utilisation bétaine (1.3 M)

Produit / réactif	Quantité [µl] dans 20 µl rxn	Concentration finale
- 5x Phire® Reaction buffer	4	1×
- dNTPs (10 mM)	0.4	200 µM
- Mélange amorces (2 µM)	2	0.2 µM
- Bétaine (13 M)	2	1.3 M
- Echantillon ADN	11.2	~ 10 ng
- Phire® Hot Start II DNA Polymerase	0.4	-

Pour les essais PCR effectués avec (tableau 18) et sans (tableau 20) DMSO mentionnés ci-

dessus, une PCR a également été effectuée avec une modification des conditions de cycle, la température d'hybridation a été diminuée de 2°C.

Un essai a également été effectué en éliminant l'étape d'hybridation à la PCR, la composition du master mix étant semblable à celle du tableau 20, les conditions de cycle pour cet essai se trouvent dans le tableau 22.

Tableau 22 : conditions de cycles pour la PCR sans extension

Etape du cycle	Temps	Température
- Dénaturation initiale	3 min	98°C
- Dénaturation	5 sec	98°C
- Hybridation	5 sec	61°C
Nombre de cycles	35	-
- Extension finale	1 min	72°C

2.2.7.3. Application de la méthode PCR sélectionnée

L'intégralité des échantillons d'ADN extraits a été analysée à l'aide de la réaction et des conditions de cycle PCR se trouvant dans les tableaux 23 et 24 suivants.

Tableau 23 : essai sans utilisation de DMSO

Produit / réactif	Quantité [µl] dans 20 µl rxn	Concentration finale
- Eau PCR	0.6	-
- 5x Phire® Reaction buffer	4	1x
- dNTPs (10 mM)	0.4	200 µM
- Mélange amorces (2 µM)	2	0.2 µM
- Echantillon ADN	12.6	~ 10 ng*
- Phire® Hot Start II DNA Polymerase	0.4	-

*les concentrations en ADN exactes utilisées pour chaque souche se trouvent en annexe 7

Tableau 24 : conditions de cycles pour la PCR

Etape du cycle	Temps	Température
- Dénaturation initiale	3 min	98°C
- Dénaturation	5 sec	98°C
- Hybridation	5 sec	61°C
Nombre de cycles	35	-
- Extension finale	1 min	72°C

Les contrôles positifs et négatifs utilisés ainsi que la préparation du mélange d'amorces sont identiques au chapitre 2.2.7.1.

2.2.8. PCR en temps réel (qPCR)

Lors du projet « Staphtox », les analyses ont été effectuées à l'aide de la PCR en temps réel, la quantification a été effectuée à l'aide d'une sonde de fluorescence. Les produits PCR ont également été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Afin de pouvoir comparer les résultats du projet « Staphtox » à ceux obtenus lors de ce travail, une qPCR a été effectuée sur l'intégralité des échantillons. Cette dernière a été réalisée selon les conditions de cycles et la composition du master mix défini lors du projet « Staphtox », tableaux 25 et 26. Cependant, les produits PCR étant uniquement interprétés par électrophorèse sur gel d'agarose, l'utilisation d'une sonde de fluorescence n'est pas nécessaire et la composition du master mix est modifiée.

Tableau 25 : master mix utilisé pour la PCR en temps réel

Produit / réactif	Quantité [µl] dans 20 µl rxn	Concentration finale
- 2x Rotor-Gene™ Multiplex PCR Master Mix	10	1x
- Mélange amorces	2	0.2 µM
- MgCl ₂ (25mM)	2	2.5 mM
- Echantillon ADN	6	~ 10 ng

Tableau 26 : conditions de cycles pour la qPCR

Etape du cycle	Temps	Température
- Dénaturation initiale	10 min	95°C
- Dénaturation	5 sec	95°C
- Hybridation	30 sec	54°C
Nombre de cycle	35	-

La préparation du master mix et des échantillons nécessite différentes précautions afin d'éviter les contaminations. La préparation du master mix est effectuée dans une pièce isolée de tout contact avec les échantillons d'ADN. Ces derniers ont ensuite été ajoutés à la réaction sous flux laminaire.

2.2.9. Analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

L'analyse des produits PCR obtenus est effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose (1.75%). La préparation de ce dernier est identique au point 2.2.6., analyse quantitative de l'ADN extrait, cependant la préparation des échantillons diffère. 20 µl des produits PCR sont mélangés avec 4 µl de tampon de charge, le xylène cyanol, puis chargés sur le gel d'agarose. 5 µl d'un marqueur de taille (100 pb) sont également déposés sur le gel.

La migration est effectuée à 120 V pendant 1 heure¹⁰, une fois cette dernière terminée, la lecture du gel est effectuée sur lampe UV. Après 40 minutes de migration, une première lecture du gel est également effectuée.

3. Résultats

3.1. Sélection de la matrice alimentaire et des souches utilisées lors de ce travail

La sélection de la matrice alimentaire a été effectuée en fonction du cahier des charges reçu, choix entre une crème dessert et un fromage à pâte molle. Lors de ce travail, l'utilisation de la crème dessert vanille a été choisie. La composition de cette dernière ainsi que son pH et sa valeur a_w se trouvent en annexe 8.

Lors de ce travail, dont le but était de détecter les gènes des entérotoxines staphylococciques, différentes souches de *Staphylococcus* ont été utilisées, *S. aureus* (cf. tableau 5) et *S. non aureus* (Staphylocoque à coagulase négative), tels que *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* et *S. warneri*. Pour *S. aureus*, les différentes souches choisies contiennent des entérotoxines connues, excepté pour *S. aureus* DSM 799 et DSM 1104. Ces dernières se trouvent dans le tableau 37 et ont été sélectionnées à l'aide du projet « Staphtox ».

Différentes souches de non *S. aureus* ont également été utilisées comme contrôle négatif tout au long de ce travail pour vérifier la sélectivité des méthodes employées. Ces dernières ont été sélectionnées en fonction de leur possible présence dans les deux matrices alimentaires citées ci-dessus, la crème dessert vanille et le fromage à pâte molle. Ce dernier pouvant être fabriqué à partir de lait cru, la sélection des souches a principalement été effectuée selon leur possible présence dans la flore de ces derniers. Les germes pathogènes sélectionnés sont *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* [14] et *Bacillus cereus* [15]. *Enterococcus faecalis* a également été utilisé, ce dernier étant un indicateur fécal dans les aliments ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* [16], présent dans la flore d'altération du lait cru. *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus plantarum* ont principalement été sélectionnés pour leur présence dans le fromage à pâte molle.

3.2. Sélection du milieu d'enrichissement sélectif et optimal à la croissance de *Staphylococcus aureus*

La sélection du milieu d'enrichissement sélectif et optimal à la croissance de *S. aureus* a été effectuée en deux temps, une pré-sélection des milieux a été effectuée à l'aide de recherches de littérature et la sélection finale par des essais pratiques.

La pré-sélection des milieux a été effectuée à l'aide de la littérature. Dans cette dernière, l'utilisation de nombreux milieux sélectifs liquides à la croissance de *S. aureus* ont été décrits, tels que le bouillon hypersalé, Giolitti et Cantoni, Tryptic Soy Broth + NaCl et le milieu BP liquide [17].

Les milieux ont été choisis en fonction de leur facteur de sélectivité. *S. aureus* étant capable de croître à de hautes teneurs en sel, la sélectivité des milieux est obtenue par l'utilisation de NaCl. Deux milieux correspondants à ces critères ont été sélectionnés pour les essais pratiques, les bouillons hypersalés (Buttiaux et Brogniart) et Tryptic Soy Broth (TSB) + NaCl (10%).

La sélection finale du milieu a été effectuée selon la méthode 2.2.2. La sélectivité des milieux a été évaluée à l'aide de 3 souches de *Staphylococcus* (*S. aureus* et *S. non aureus*), chacune mise en croissance dans les milieux sélectifs pré-sélectionnés et la matrice alimentaire ainsi qu'avec 5 autres souches de non *Staphylococcus*. Les résultats obtenus se trouvent dans les tableaux 27 à 29.

Tableau 27 : croissance de *S. aureus* FRI137 dans les milieux Buttiaux Brogniart et TSB + 10% NaCl avec les cinq autres souches non *S. aureus*

<i>S. aureus</i> FRI137	Milieu Buttiaux Brogniart		Milieu TSB + 10% NaCl	
	Nombre de germes [ufc/g]		Nombre de germes [ufc/g]	
	initial (N0)	final (Nf)	initial (N0)	final (Nf)
<i>S. typhimurium</i>	$< 3.5 \cdot 10^2$ ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g
<i>B. cereus</i>	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g
<i>E. coli</i>	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g
<i>L. monocytogenes</i>	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g
<i>E. faecalis</i>	$1.9 \cdot 10^3$ ufc/g	$1.55 \cdot 10^3$ ufc/g	$1.15 \cdot 10^3$ ufc/g	> 30000 ufc/g
<i>S. aureus</i>	$1 \cdot 10^3$ ufc/g	$< 10^8$ ufc/g	$< 1.5 \cdot 10^2$ ufc/g	$1.3 \cdot 10^9$ ufc/g

Tableau 28 : croissance de *S. aureus* CCM5757 dans les milieux Buttiaux Brogniart et TSB + 10% NaCl avec les cinq autres souches non *S. aureus*

<i>S. aureus</i> CCM5757	Milieu Buttiaux Brogniart		Milieu TSB + 10% NaCl	
	Nombre de germes [ufc/g]		Nombre de germes [ufc/g]	
	initial (N0)	final (Nf)	initial (N0)	final (Nf)
<i>S. typhimurium</i>	$1.4 \cdot 10^3$ ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g
<i>B. cereus</i>	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	$< 5.5 \cdot 10^2$ ufc/g	< 100 ufc/g
<i>E. coli</i>	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g
<i>L. monocytogenes</i>	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g
<i>E. faecalis</i>	$2.35 \cdot 10^3$ ufc/g	$1.05 \cdot 10^3$ ufc/g	$1.75 \cdot 10^3$ ufc/g	> 30000 ufc/g
<i>S. aureus</i>	$1.65 \cdot 10^3$ ufc/g	$< 2 \cdot 10^8$ ufc/g	$1.45 \cdot 10^3$ ufc/g	$1.6 \cdot 10^8$ ufc/g

Tableau 29 : croissance de *S. aureus* CCM5757 dans les milieux Buttiaux Brogniart et TSB + 10% NaCl avec les cinq autres souches non *S. aureus*

<i>S. capitis</i> spp.	Milieu Buttiaux Brogniart		Milieu TSB + 10% NaCl	
	Nombre de germes [ufc/g]		Nombre de germes [ufc/g]	
	initial (N0)	final (Nf)	initial (N0)	final (Nf)
<i>S. typhimurium</i>	$< 5 \cdot 10^2$ ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g
<i>B. cereus</i>	$< 1.5 \cdot 10^2$ ufc/g	< 100 ufc/g	$< 2 \cdot 10^2$ ufc/g	$< 2 \cdot 10^2$ ufc/g
<i>E. coli</i>	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g
<i>L. monocytogenes</i>	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g
<i>E. faecalis</i>	$3.55 \cdot 10^3$ ufc/g	$1.45 \cdot 10^3$ ufc/g	$1.6 \cdot 10^3$ ufc/g	> 30000 ufc/g
<i>S. capitis</i>	$< 1.5 \cdot 10^2$ ufc/g	$< 10^8$ ufc/g	< 100 ufc/g	$< 3.5 \cdot 10^8$ ufc/g

D'une manière générale, il est possible de constater que le dénombrement des germes n'est pas précis (inférieur à) pour les souches de *S. typhimurium*, *B. cereus*, *E. coli* et *L. monocytogenes*, ce qui est dû à l'ensemencement de dilutions trop élevées (< 10 germes/plaque), cependant la tendance est identique, aucune croissance n'est observée. Les trois tableaux précédents permettent de constater que l'efficacité des deux milieux sélectifs est presque similaire, excepté pour les Staphylocoques et *E. faecalis*. Le milieu Buttiaux Brogniart permet d'inhiber la croissance d'*E. faecalis*, contrairement au milieu TSB + 10% NaCl. Cependant, ce dernier permet une croissance plus optimale à *S. aureus*.

En fonction des résultats obtenus pour les souches de Staphylocoques et d'*E. faecalis*, le milieu Buttiaux Brogniart est plus sélectif qu'optimal à la croissance de *S. aureus* et inversement pour le milieu TSB + 10% NaCl. Afin de confirmer ces résultats, *E. faecalis* et une souche de *S. aureus* ont été mis en croissance, selon la méthode 2.2.3., dans les deux milieux sélectifs. Un troisième milieu a également été testé afin de trouver une alternative aux deux autres cités précédemment, TSB + 15% NaCl. Les résultats obtenus se trouvent dans le tableau 30.

Tableau 30 : croissance de *S. aureus* FRI137 et *E. faecalis* dans différents milieux sélectifs

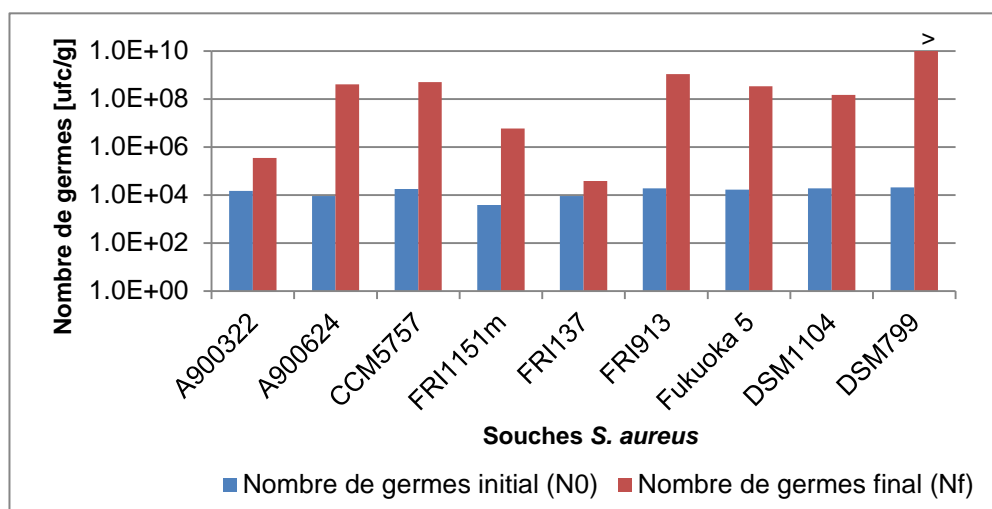
Souche	Milieu	Nombre de germes [ufc/g]	
		initial (N0)	final (Nf)
<i>E. faecalis</i>	Milieux Buttiaux Brogniart	$1.52 \cdot 10^3$	$< 2 \cdot 10^3$
	Milieux TSB + 10% NaCl	$1.03 \cdot 10^3$	$5.8 \cdot 10^8$
	Milieux TSB + 15% NaCl	$1.41 \cdot 10^3$	$2.35 \cdot 10^4$
<i>S. aureus</i> FR3137	Milieux Buttiaux Brogniart	$1.7 \cdot 10^2$	$1.9 \cdot 10^5$
	Milieux TSB + 10% NaCl	$1.95 \cdot 10^2$	$8.8 \cdot 10^7$
	Milieux TSB + 15% NaCl	$1.7 \cdot 10^2$	$2.65 \cdot 10^7$

Le tableau 30 permet de confirmer les résultats précédents concernant la croissance de *S. aureus* et *E. faecalis* dans le milieu Buttiaux Brogniart et TSB + 10% NaCl. Il est également possible d'observer que le milieu TSB + 15% NaCl offre des conditions de croissance optimales à *S. aureus* et permet également de minimiser la croissance d'*E. faecalis*, il est optimal et sélectif.

3.3. Croissance des souches dans le milieu d'enrichissement sélectif

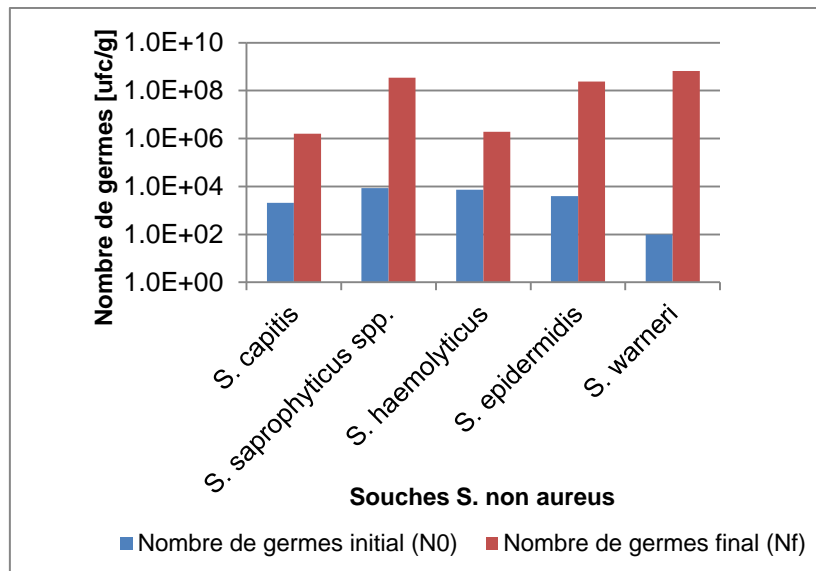
La croissance de toutes les souches a été effectuée dans le milieu TSB + 15% NaCl avec la matrice alimentaire, selon la méthode 2.2.3. Sept souches ont également été mises en croissance uniquement dans le milieu sélectif. Les résultats des croissances sont exprimés sous forme de graphique et se trouvent sous forme détaillée en annexe 9.

Le graphique 1 représente la croissance des différentes souches de *S. aureus* dans la matrice alimentaire et le milieu d'enrichissement sélectif TSB + 15% NaCl après 24 heures d'incubation. Il est possible de constater que toutes les souches, excepté A900322, FRI1151m et FRI137, ont une croissance optimale et supérieure à $1 \cdot 10^8$ ufc/g. La croissance maximale est de $1.1 \cdot 10^9$ ufc/g



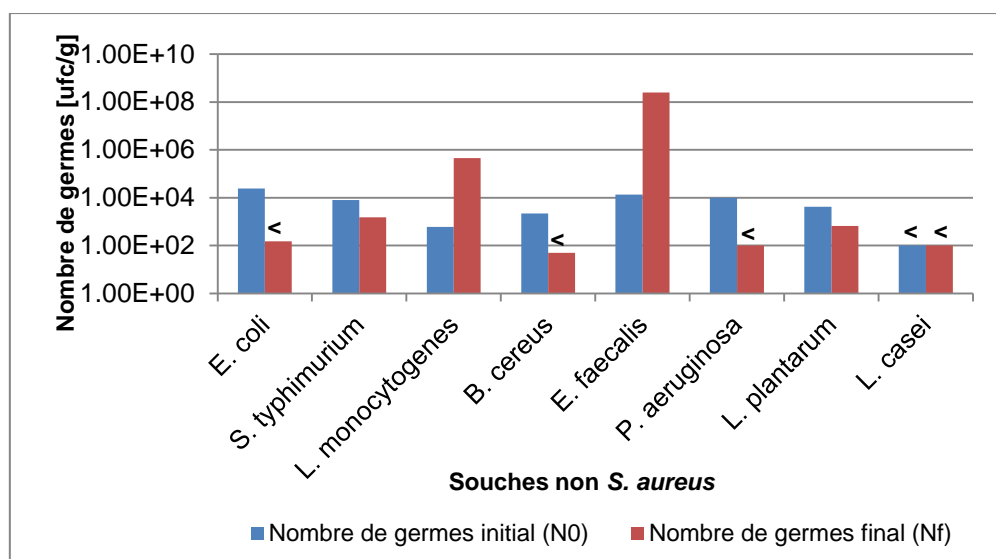
Graphique 1 : Croissance des différentes souches de *S. aureus* dans la matrice alimentaire et le milieu d'enrichissement spécifique

En ce qui concerne la croissance des souches de *S. non aureus*, il est possible de constater que le milieu n'inhibe pas cette dernière. Le graphique 2 présente la croissance des différentes souches dans la matrice alimentaire et le milieu d'enrichissement sélectif, il est possible d'observer que la croissance minimale est de $1.6 \cdot 10^6$ ufc/g et la croissance maximale de $6.7 \cdot 10^8$ ufc/g.



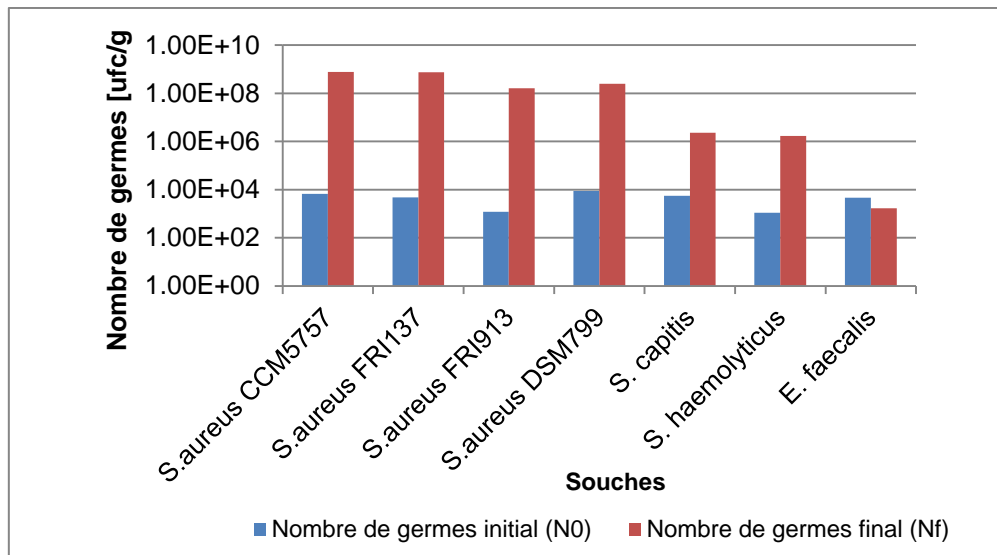
Graphique 2 : Croissance des différentes souches de *S. non aureus* dans la matrice alimentaire et le milieu d'enrichissement spécifique

D'une manière générale, il est possible de constater que les souches de non *S. aureus* sont inhibées par le milieu sélectif, excepté *L. monocytogenes*, *E. faecalis* et *L. casei*. La croissance de ces dernières est cependant modérée, sauf pour *E. faecalis* dont la croissance est de $2.5 \cdot 10^8$ ufc/g. Les résultats se trouvent dans le graphique 3.



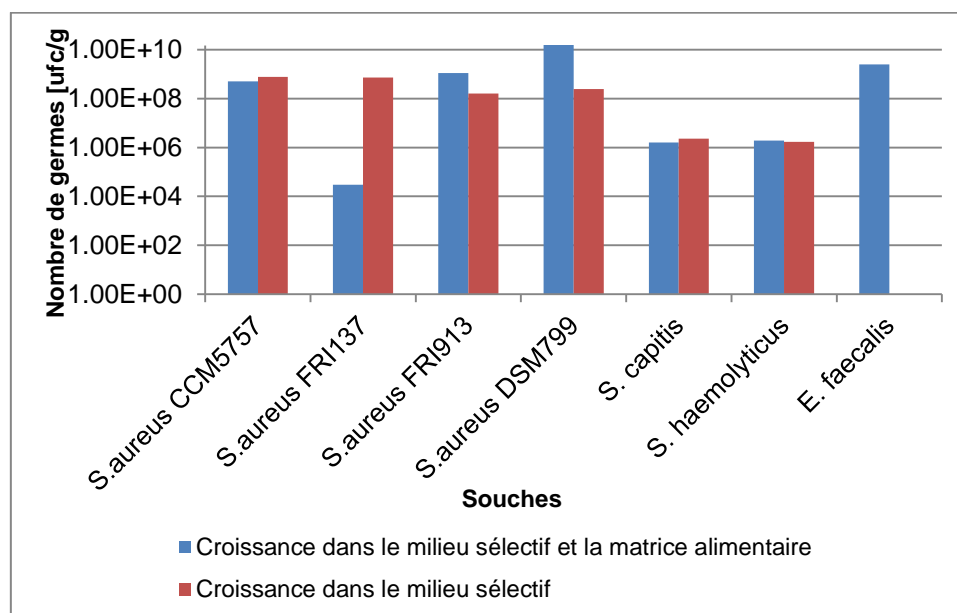
Graphique 3 : Croissance des différentes souches de non *S. aureus* dans la matrice alimentaire et le milieu d'enrichissement spécifique

Les croissances des sept souches effectuées dans le milieu d'enrichissement sélectif se trouvent dans le tableau 4. Il est possible de constater que la croissance des souches de *S. aureus* est plus optimale que celles des souches non *S. aureus*. En ce qui concerne *E. faecalis*, le milieu inhibe la croissance et permet une réduction du nombre de germes initial.



Graphique 4 : Croissance des différentes souches de non *S. aureus* dans le milieu d'enrichissement spécifique

Le graphique 5 représente la croissance des sept souches dans le milieu d'enrichissement sélectif et la matrice alimentaire en comparaison à leur croissance dans le milieu sélectif seul. La croissance est exprimée en fonction de la différence entre le nombre de germes initial et final en ufc/g de chaque souche.



Graphique 5 : Comparaison des croissances des souches dans le milieu d'enrichissement sélectif et la matrice alimentaire et des souches dans le milieu d'enrichissement sélectif

A l'aide des résultats du graphique 5, il est possible de constater que la croissance des souches *S. aureus* CCM5757, *S. capitis* et *S. haemolyticus* dans le milieu sélectif avec et sans la denrée alimentaire est presque similaire. Les résultats pour la souche de *S. aureus* FRI137 démontrent une croissance plus faible dans le milieu d'enrichissement et la denrée alimentaire que sans cette dernière. En ce qui concerne *S. aureus* FRI913 et DSM799 ainsi que *E. faecalis* la croissance des germes dans le milieu sélectif et la matrice alimentaire est plus importante que sans cette dernière. En ce qui concerne *E. faecalis*, sa croissance dans le milieu sélectif implique une réduction du nombre de germes de $2.9 \cdot 10^3$ ufc/g contrairement à sa croissance avec la denrée alimentaire qui permet une augmentation du nombre de germes de $2.5 \cdot 10^8$ ufc/g. Les résultats obtenus étant à l'opposé l'un de l'autre, la croissance d'*E. faecalis* dans la matrice alimentaire a été répétée deux fois. Pour chacun des essais, une réduction du nombre de germes a été démontrée, $3.9 \cdot 10^3$ et

$4.7 \cdot 10^3$ ufc/g, contrairement aux résultats précédents.

3.4. Extraction d'ADN avec la lysostaphine

L'extraction d'ADN a été effectuée selon la méthode 2.2.4. et sur toutes les souches mentionnées ci-dessus après croissance dans le milieu sélectif avec et sans matrice alimentaire. Les souches se trouvant dans le bouillon de pré-culture (TSB), cf. méthode 2.2.3., ont également été extraites. La quantification de l'ADN a été effectuée à l'aide du Qubit selon la méthode 2.2.6. et les résultats obtenus se trouvent dans le tableau 31, en fonction du milieu dans lequel la croissance des souches a eu lieu.

Tableau 31 : quantité d'ADN extrait en $\mu\text{g}/\text{m}$ pour les différentes souches en fonction de leur milieu de croissance

Souche	Quantité d'ADN extrait [$\mu\text{g}/\text{ml}$] ou [$\text{ng}/\mu\text{l}$]		
	milieu TSB	milieu sélectif et matrice alimentaire	milieu sélectif
<i>S. aureus</i> A900322	14.8	< 0.010	-
<i>S. aureus</i> A900624	42.7	0.887	-
<i>S. aureus</i> CCM5757	9.35	0.708	0.250
<i>S. aureus</i> FRI1151m	8.9	0.318	-
<i>S. aureus</i> FRI137	22.1	< 0.010	0.360
<i>S. aureus</i> FRI913	33.6	3.12	< 0.010
<i>S. aureus</i> Fukuoka 5	22.9	0.496	-
<i>S. aureus</i> DSM1104	69.5	9.31	-
<i>S. aureus</i> DSM799	0.845	0.475	< 0.010
<i>S. capitis</i>	2.0	0.149	< 0.010
<i>S. epidermidis</i>	30.5	0.929	-
<i>S. haemolyticus</i>	0.911	0.711	< 0.010
<i>S. saprophyticus</i> spp.	0.845	0.752	-
<i>S. warneri</i>	1.07	0.656	-
<i>E. coli</i>	140	< 0.010	-
<i>S. typhimurium</i>	110	< 0.010	-
<i>L. monocytogenes</i>	67.5	< 0.010	-
<i>B. cereus</i>	168	< 0.010	-
<i>E. faecalis</i>	100	0.937	< 0.010
<i>P. aeruginosa</i>	88.3	0.104	-
<i>L. plantarum</i>	12.3	1.77	-
<i>L. casei</i>	80.9	< 0.010	-

D'une manière générale, il est possible d'observer que la quantité d'ADN extraite des souches est supérieure dans le milieu de croissance TSB avec un nombre de germes plus élevé que dans les deux autres.

Pour les souches de *S. aureus*, la quantité minimale d'ADN extraite est de 0.318 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour les souches mises en croissance dans le milieu sélectif et la matrice alimentaire, excepté pour *S. aureus* A900322 et FRI137, où la concentration est < 0.010 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En comparant les résultats avec les nombres de germes présents lors de l'extraction, annexe 10, il est possible de constater que la quantité d'ADN est quantifiable à partir d'un nombre de germes $\geq 6 \cdot 10^6$ ufc/g. Cependant, pour les quatre souches se trouvant dans le milieu sélectif seul, l'ADN peut être quantifié uniquement pour *S. aureus* A900322 et FRI137, pour un nombre de germes similaire, $\geq 1.6 \cdot 10^8$ ufc/g.

Lors de l'extraction des souches *S. non aureus* en présence de la denrée alimentaire, la quantité d'ADN obtenue est très similaire à celle obtenue pour *S. aureus*. La quantité minimale est de 0.149 µg/ml pour $1.6 \cdot 10^6$ ufc/g. Pour le milieu sélectif seul, la quantité d'ADN extraite n'est pas quantifiable pour un nombre de germes $< 2.3 \cdot 10^6$ ufc/g.

En ce qui concerne les souches de non *S. aureus*, la quantité d'ADN extraite dans le milieu sélectif avec la denrée alimentaire est < 0.010 µg/ml, excepté pour *E. faecalis*, *P. aeruginosa* et *L. plantarum*. Globalement, la quantité d'ADN obtenue est < 0.010 µg/ml pour un nombre de germes $< 4.5 \cdot 10^5$ ufc/g.

La méthode d'extraction d'ADN utilisée a également été testée afin de déterminer si l'ADN ne subit pas de dégradation. Après extraction, l'ADN d'une souche de *S. aureus* (CCM5757) a été analysée (figure 1) selon la méthode 3.2.5. Aucune dégradation de l'ADN n'est observée, le fragment obtenu sur gel d'agarose est net.

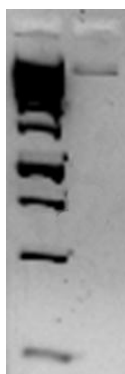


Figure 2 : analyse qualitative de l'ADN extrait de *S. aureus* CCM5757

3.5. Sélection d'une méthode PCR pour la détection des entérotoxines staphylococciques

Afin de déterminer une méthode PCR permettant la détection des gènes des entérotoxines staphylococciques, les conditions de cycles et la composition du master mix de cette dernière doivent être définis et dépendent de l'enzyme utilisée. Une fois la méthode déterminée, cette dernière est optimisée.

3.5.1. Choix de l'enzyme et des conditions PCR

Lors de ce travail de diplôme, deux enzymes ont été mises à disposition afin de pouvoir effectuer les analyses PCR, 2x KAPA 2G Fast Ready Mix et Phire® Hot Start II DNA Polymerase. La sélection de l'enzyme la plus appropriée pour la réaction PCR a été effectuée selon la méthode 2.2.7.1.

Les différents échantillons analysés pour les deux enzymes se trouvent dans le tableau 32. Les échantillons sans denrée alimentaire représentent les souches mises en croissance dans le milieu de pré-culture TSB et non dans le milieu sélectif TSB + 15% NaCl. Les résultats obtenus après électrophorèse sur gel d'agarose se trouvent sur les figures 3 et 4.

Tableau 32 : échantillons utilisés lors de la PCR avec l'enzyme 2x KAPA 2G Ready Mix et PhireHot® Start II DNA polymerase

N°	Echantillon	N°	Echantillon
1	<i>S. aureus</i> CCM5757 + DA	6	Plasmide E
2	<i>S. aureus</i> FRI913 + DA	7	Plasmide K
3	<i>S. aureus</i> CCM5757	8	Plasmide L
4	<i>S. aureus</i> FRI913	9	Plasmide Q
5	<i>E. faecalis</i> + DA	10	Contrôle PCR

En ce qui concerne les échantillons analysés, les deux souches de *S. aureus* peuvent produire différentes toxines, SEB,K,Q pour *S. aureus* CCM5757 et SEA,C,E,K,L,Q,R pour *S. aureus* FRI913. Les plasmides contenant le gène isolé d'une entérotoxine staphylococcique sont utilisés comme contrôle positif, détectés avec succès lors du projet « Staphtox », ils permettent de vérifier les résultats PCR obtenus. Pour *E. faecalis*, la présence de toxine n'étant pas connue, il sert de contrôle négatif. Afin de vérifier qu'aucune contamination ne soit survenue lors de la préparation des échantillons un contrôle négatif a également été effectué pour la réaction PCR.

La PCR effectuée à l'aide de l'enzyme 2x KAPA 2G Fast Ready Mix permet d'obtenir les résultats se trouvant sur la figure 3. D'une manière générale, il est possible d'observer la forte présence de dimères d'amorces (en dessous de 100 pb). Il est également possible de constater que pour les échantillons 1 à 4 contenant la même souche de *S. aureus*, CCM5757 ou FRI913, les résultats obtenus avec ou sans denrée alimentaire ne sont pas similaires. *S. aureus* FRI913 possède un fragment supplémentaire visible lors de la PCR avec la denrée alimentaire et inversement pour *S. aureus* CCM5757. Pour chaque plasmide contenant le gène isolé d'une toxine, un seul fragment de taille connue peut être observé, 146 pb pour SEE, 127 pour SEK, 141 pour SEL et 113 pour SEQ. La présence de toxines est également détectée pour *E. faecalis*, échantillon 5.

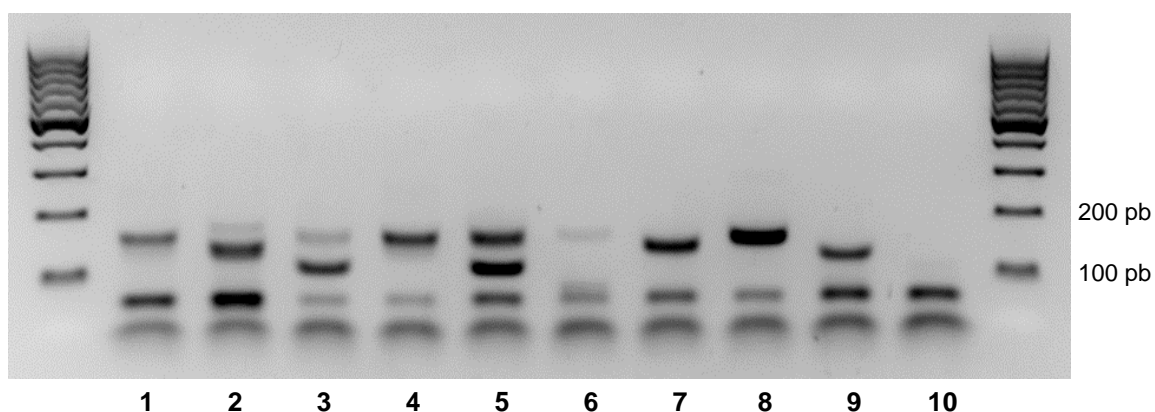


Figure 3 : PCR avec l'enzyme 2x KAPA 2G Fast Ready Mix, après 40 min de migration à 120 V

En ce qui concerne la PCR avec l'enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase, figure 4, il est possible d'observer la présence de grands fragments (en dessus de 200 pb) sur le gel. Les résultats obtenus pour les plasmides (échantillon 6 à 8) sont similaires à ceux de la PCR avec enzyme 2x KAPA 2G Fast Ready Mix. Il est possible d'observer que pour les échantillons 1 et 3 contenant *S. aureus* CCM5757 et 2 et 4 contenant *S. aureus* FRI913, le nombre de fragments obtenus est supérieur pour les échantillons contenant la denrée alimentaire. En ce qui concerne *E. faecalis*, la présence de toxine est également détectée.

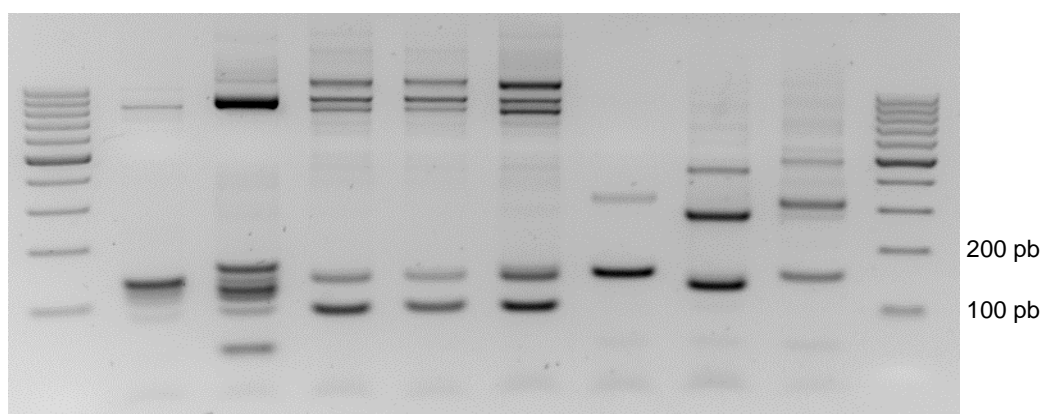


Figure 4 : PCR avec enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase, après 40 min de migration à 120 V

D'une manière générale, il est possible de constater que la PCR avec l'enzyme 2x KAPA 2G Fast Ready Mix permet de donner des résultats plus propres qu'avec l'enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase. En effet, à l'aide de cette dernière, la présence non désirée de grands fragments est observée, la taille des fragments d'ADN pour les toxines de *S. aureus* étant entre 100 et 200 pb. Cependant, contrairement à la PCR avec l'enzyme 2x KAPA 2G Fast Ready Mix, la présence de dimères d'amorces n'est pas ou presque pas visible. Il est également possible de constater que les échantillons (1 à 4) contenant les souches de *S. aureus* CCM5757 et FRI913, avec ou sans denrée alimentaire, ne donnent pas les mêmes résultats pour les deux PCR effectuées, excepté pour l'échantillon 3. En ce qui concerne *E. faecalis*, la détection de toxine est effectuée avec les deux PCR et les fragments d'ADN obtenus sur le gel d'agarose sont similaires.

Le prix de l'enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase étant plus bas que celui de 2x KAPA 2G Fast Ready Mix, la PCR avec l'enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase a été effectuée une deuxième fois afin de déterminer si la présence de grands fragments peut être évitée en modifiant les conditions de cycle. La durée d'élongation a été diminuée de 15 à 1 seconde.

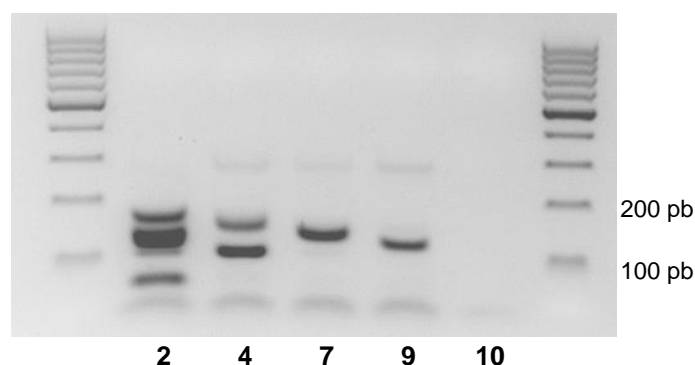


Figure 5 : PCR avec enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase avec temps extension d'une seconde, après 40 min de migration à 120 V

Il est possible de constater que les fragments d'ADN obtenus sur la figure 5 sont similaires à ceux obtenus lors de la première PCR avec l'enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase, figure 4. L'analyse des échantillons à l'aide de la PCR avec une diminution du temps d'extension permet d'éviter la formation de grands fragments. Les résultats obtenus sur le gel d'agarose sont propres, la présence de grands fragments ou de dimères d'amorce n'est pas ou très peu visible. L'enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase a été sélectionnée pour les analyses PCR, les conditions de cycle ainsi que la composition du master mix correspondant à cette dernière se trouvent dans les tableaux 33 et 34.

Tableau 33 : master mix déterminé pour la PCR avec enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase

Produit / Réactif	Quantité [µl] dans 20 µl rxn	Concentration finale
- 5x Phire® Reaction buffer	4	1x
- dNTPs (10 mM)	0.4	200 µM
- Mélange amorces (2 µM)	2	0.2 µM
- DMSO (100%)	0.6	3%
- Echantillon ADN	12.6	~ 10 ng
- Phire® Hot Start II DNA Polymerase	0.4	-

Tableau 34 : condition de cycles pour la PCR avec enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase

Etape du cycle	Temps	Température [°C]
- Dénaturation initiale	3 min	98
- Dénaturation	5 sec	98
- Hybridation	5 sec	61
- Extension	1 sec	72
Nombre de cycles	35	-
- Extension finale	1 min	72

3.5.2. Optimisation de la méthode PCR

La PCR sélectionnée a été réitérée à l'aide des mêmes échantillons utilisés ci-avant, cependant deux contrôles négatifs ont été ajoutés, *S. capitis* et *L. plantarum*. Les résultats obtenus se trouvent sur la figure 6 et les échantillons analysés dans le tableau 35.

Tableau 35 : échantillons utilisés lors de la PCR avec l'enzyme Phire Hot® Start II DNA polymerase

N°	Echantillon	N°	Echantillon
1	<i>S. aureus</i> CCM5757 + DA	8	Plasmide L
2	<i>S. aureus</i> FRI913 + DA	9	Plasmide E
3	<i>S. aureus</i> CCM5757	10	Plasmide Q
4	<i>S. aureus</i> FRI913	11	Plasmide K
5	<i>E. faecalis</i> + DA	12	Contrôle extraction ADN
6	<i>L. plantarum</i> + DA	13	Contrôle PCR
7	<i>S. capitis</i>		

D'une manière générale, la présence de grands fragments ainsi que de dimères d'amorces peuvent être observés sur le gel. En ce qui concerne les souches de *S. aureus* FRI913 et CCM5757, les résultats obtenus pour les échantillons avec matrice alimentaire ne sont nullement similaires à ceux obtenus sans. Pour *S. aureus* FRI913, le nombre de fragments est plus élevé pour l'échantillon sans matrice alimentaire. Inversement, pour *S. aureus* CCM5757 la détection de toxine n'est effectuée que pour l'échantillon avec matrice alimentaire. Pour les souches de non *S. aureus* (contrôles négatifs), *S. capitis*, *E. faecalis* et *L. plantarum*, la présence de toxine est également détectée. Les plasmides permettent d'obtenir un fragment net sur le gel d'agarose.

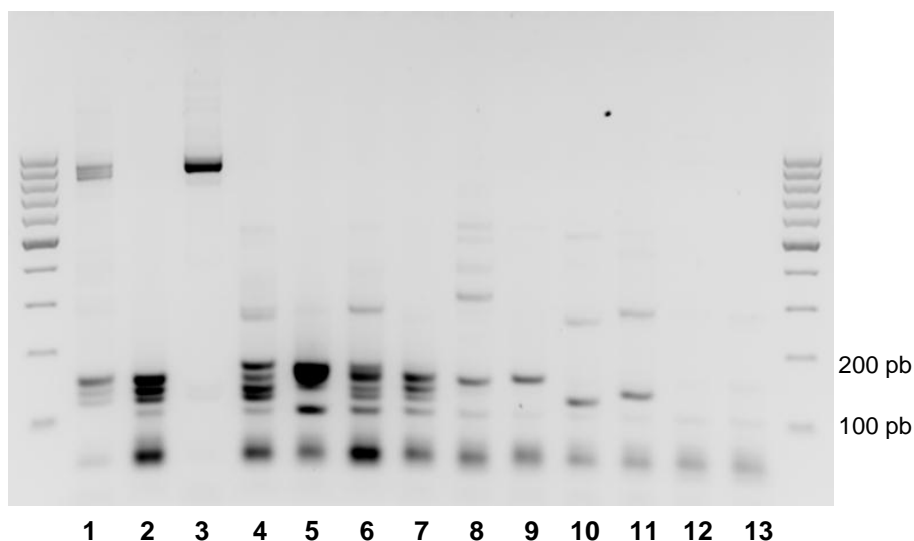


Figure 6 : PCR de base déterminée, après 1h10 de migration à 120 V

L'optimisation de la méthode PCR a été effectuée selon la méthode 2.2.7.2., cette dernière a été effectuée par la modification du master mix et des conditions de cycles. Différents essais ont été effectués à l'aide d'additifs, tels que la bétaine et le DMSO.

Un essai a été effectué sans utilisation de DMSO, présent dans le master mix de base défini, et les résultats obtenus se trouvent sur la figure 7. A l'aide de ce dernier, il est possible de constater que la présence des grands fragments et des dimères d'amorce est plus faible en comparaison avec la méthode PCR de base (figure 6). Les fragments détectés pour chaque échantillon sont similaires à ceux détectés lors de la PCR de base, cependant d'intensité légèrement plus faible.

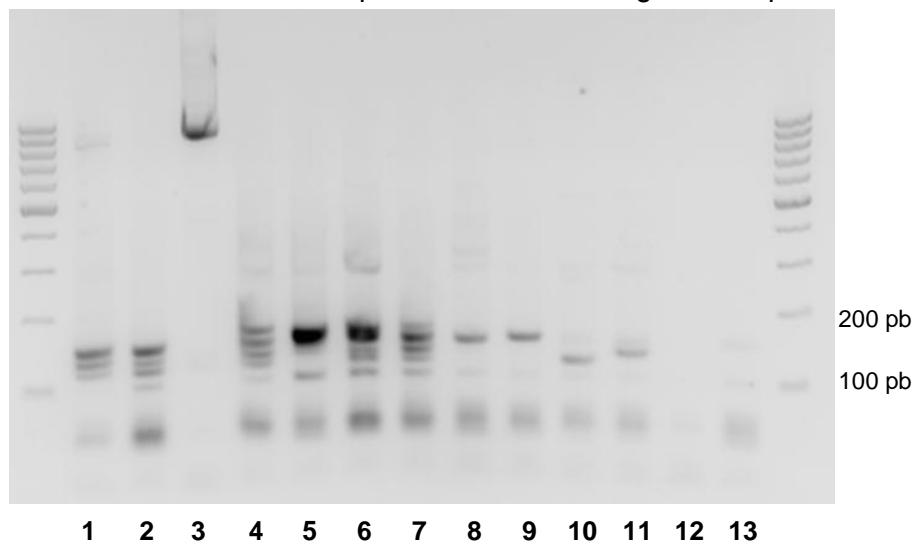


Figure 7 : PCR sans utilisation du DMSO, après 1h10 de migration à 120 V

Pour chacune des PCR avec et sans utilisation de DMSO, un essai a également été effectué en modifiant les conditions de cycles, diminution de la température d'hybridation de 2°C. A l'aide des résultats obtenus, figure 8 et 9, il est possible de voir qu'aucune amélioration n'est apportée par la diminution de la température d'hybridation. Pour chaque essai, les dimères d'amorces sont présents ainsi que les grands fragments. Les résultats obtenus sont similaires pour les différents essais, exceptés pour les plasmides. La diminution de la température d'hybridation induit la formation de fragments d'ADN supplémentaires et non spécifiques (échantillon 8 et 9).

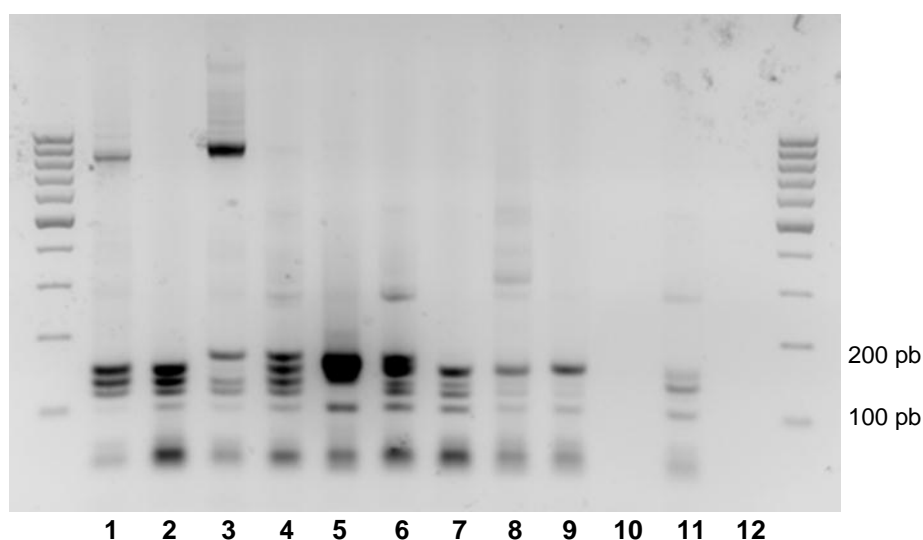


Figure 8 : PCR de base avec diminution de la température d'hybridation de 2°C, après 1h10 de migration à 120V

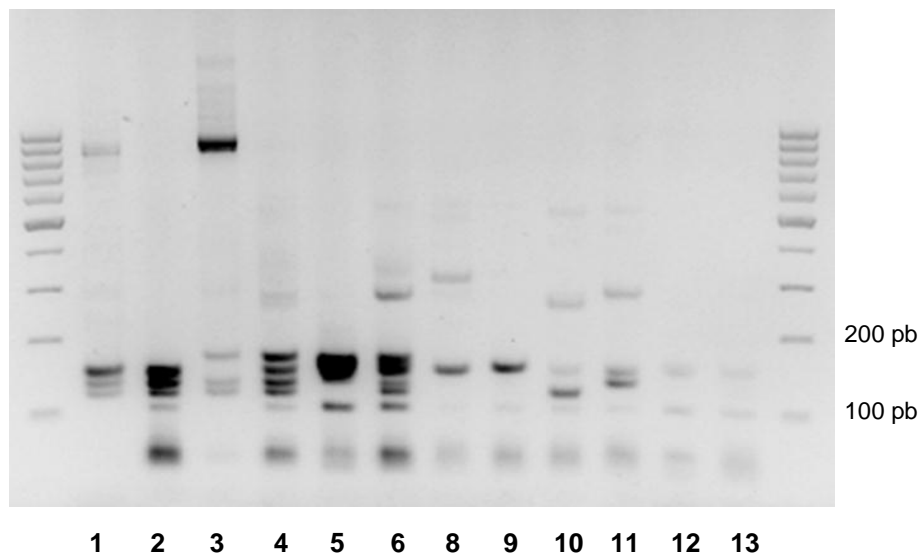


Figure 9 : PCR de base avec diminution de la température d'hybridation de 2°C, après 1h10 de migration à 120V

D'une manière générale, il est possible de constater que la PCR effectuée sans utilisation de DMSO et sans modification de la température d'hybridation donne les résultats les plus optimaux. A ce stade des essais, cette dernière est sélectionnée pour la suite.

Afin d'éviter la formation de grands fragments, un essai est également réalisé sans utilisation de DMSO et sans étape d'extension. Les échantillons utilisés sont les mêmes que lors des essais précédents, cependant les souches mises en croissance dans le milieu sélectif sans matrice alimentaire (souche + M) ont également été analysées. Ces dernières se trouvent dans le tableau suivant.

Tableau 36 : échantillons utilisés lors de la PCR sans étape d'élongation

N°	Echantillon	N°	Echantillon
1	<i>S. aureus</i> FRI913 + M	10	<i>S. capitis</i> + M
2	<i>S. aureus</i> FRI913	11	<i>S. capitis</i> + DA
3	<i>S. aureus</i> FRI913 + DA	12	Plasmide E
4	<i>S. aureus</i> CCM5757 + M	13	Plasmide L
5	<i>S. aureus</i> CCM5757	14	Plasmide Q
6	<i>S. aureus</i> CCM5757 + DA	15	Plasmide K
7	<i>E. faecalis</i> + M	16	Contrôle extraction ADN
8	<i>E. faecalis</i> + DA	17	Contrôle PCR
9	<i>L. plantarum</i> + DA		

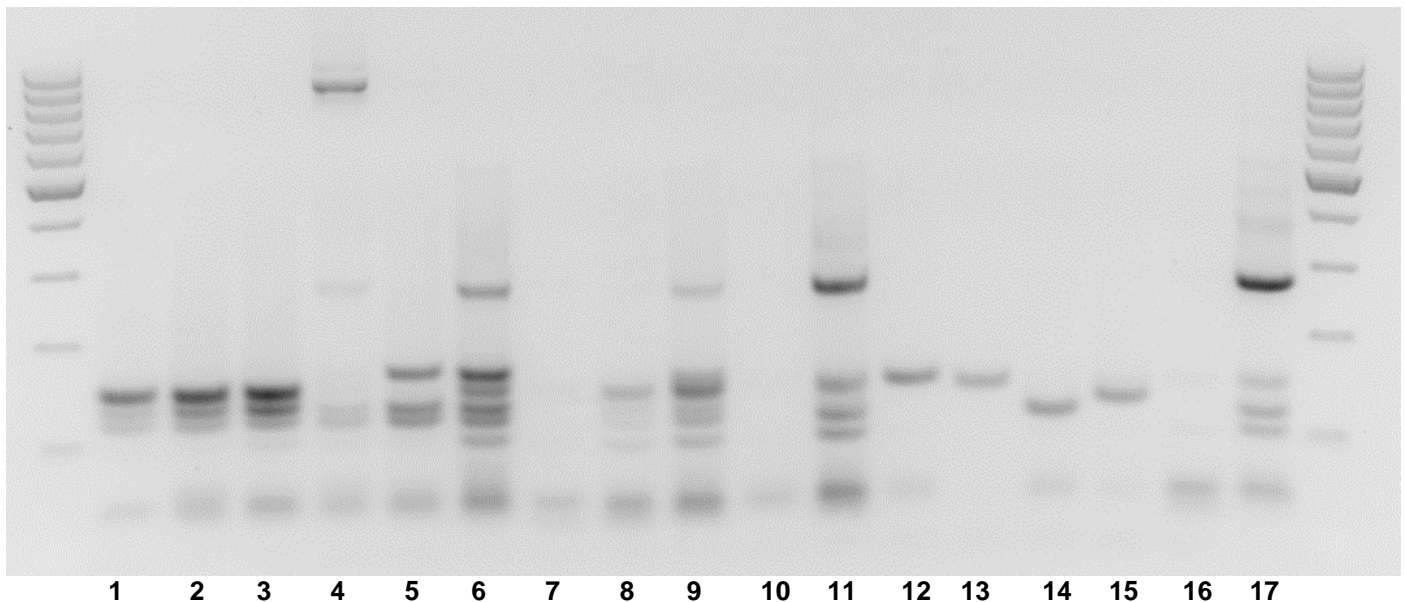


Figure 10 : PCR sans utilisation de DMSO et sans étape d'extension, après 1h10 de migration à 120V

La PCR sans étape d'extension permet une diminution des grands fragments et de la présence des dimères d'amorces, figure 10.

Les échantillons 1 à 3 présentent les résultats obtenus pour *S. aureus* FRI913, ces derniers sont similaires, le même nombre de fragments est obtenu cependant d'intensité différente. Pour *S. aureus* CCM5757, les résultats obtenus sont identiques pour les souches mises en croissance dans le milieu de pré-culture ou sélectif mais d'intensité différente. En ce qui concerne l'échantillon avec la matrice alimentaire et le milieu sélectif, le nombre de fragments est supérieur aux deux autres. Pour les souches de non *S. aureus*, la présence de toxine est détectée dans les échantillons 8, 9 et 11 issus de la croissance des souches dans la matrice alimentaire et le milieu sélectif. Les échantillons 7 et 9, *E. faecalis* et *S. capitis* avec le milieu sélectif, ne présentent aucun fragment, aucune toxine n'est détectée. Pour les plasmides contenant les toxines isolées, un fragment net est obtenu sans présence de grands fragments ou de dimères. A l'aide des échantillons 16 et 17, il est possible d'observer que le contrôle d'extraction d'ADN est bon, négatif et que le contrôle PCR a subi une contamination lors de sa préparation.

L'utilisation de DMSO et l'élimination de l'étape d'extension permettent de diminuer la formation des dimères d'amorces et des grands fragments lors de la PCR, cette méthode est donc la plus appropriée. Cette dernière est sélectionnée pour l'analyse PCR finale des entérotoxines staphylococciques dans les différentes souches bactériennes.

La bétaine (1.3M) a également été testée dans le but d'une optimisation de la PCR. Cette dernière a permis une très faible diminution de la présence des grands fragments, cependant les dimères d'amorces sont toujours aussi présents. Par manque de temps, l'action de la bétaine n'a été étudiée qu'une fois la méthode PCR sélectionnée, les résultats n'ont donc pas été décisifs lors de ce travail. Ces derniers se trouvent en annexe 11 et n'ont pas été discutés.

3.6. Détection des entérotoxines staphylococciques

L'analyse des entérotoxines staphylococciques des différentes souches bactériennes a été effectuée à l'aide de la méthode 2.2.7., PCR déterminée ci-avant. Les résultats sont exprimés en fonction de la souche analysée, *S. aureus*, *S. non aureus* et non *S. aureus*. Pour chacune de ces dernières, un premier gel contient les échantillons des souches mises en croissance dans le milieu de pré-culture (TSB) et le deuxième, ceux mis en croissance dans le milieu sélectif, avec (A) ou sans denrée alimentaire (B).

D'une manière générale, il est possible d'observer la présence d'un fragment à 100 pb, de plus ou moins faible intensité, ainsi que celle de grands fragments et de dimères d'amorces pour tous les essais effectués.

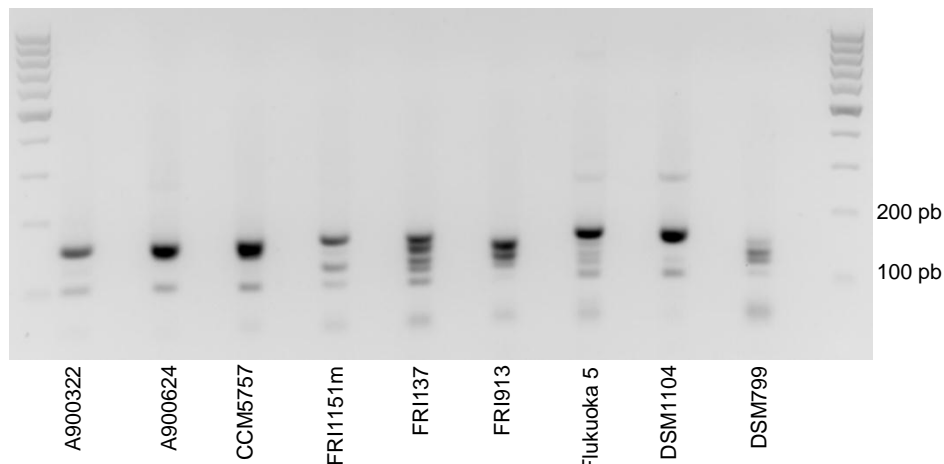


Figure 11 : souche de *S. aureus* mises en croissance dans le milieu de pré-culture (TSB)

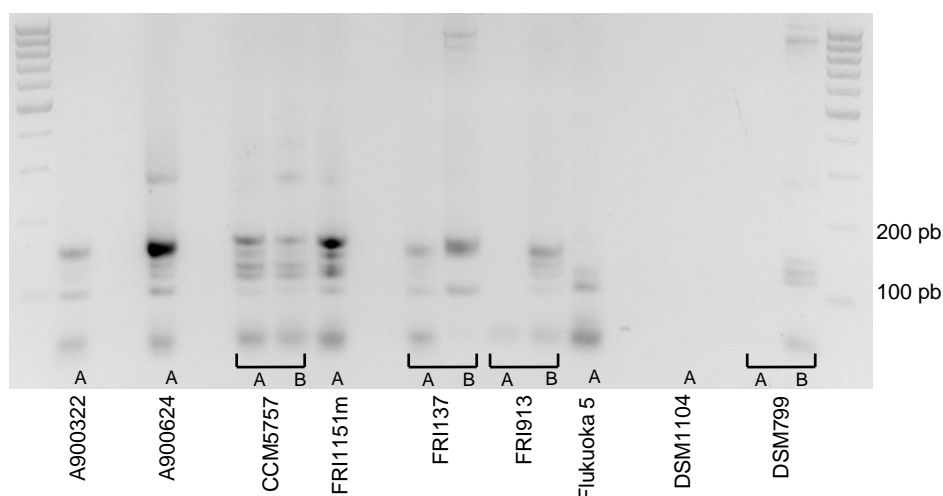


Figure 12 : souche de *S. aureus* mises en croissance dans le milieu sélectif avec (A) ou sans (B) matrice alimentaire

Le nombre de fragments obtenus est plus élevé pour les souches de *S. aureus* dans le milieu sélectif avec la denrée alimentaire que dans le milieu de pré-culture, figure 11. En comparant les échantillons A et B de la figure 12, avec et sans denrée alimentaire, les résultats ne sont pas similaires, excepté pour CCM5757.

Chacune des souches de *S. aureus* testée contient des toxines différentes. A l'aide des résultats obtenus pour les plasmides contenant les différentes toxines isolées E (146 pb), K (127 pb), L (141 pb) et Q (113 pb), figure 17, certains fragments peuvent être identifiés ou leur taille évaluée. Ces derniers se trouvent dans le tableau 37, en fonction de la souche utilisée et des toxines qu'elle contient, taille des produits (pb) définie par les amorces utilisées (cf. annexe 1). Les deux fragments pour les toxines E et L sont difficilement différenciables, la taille de ces derniers étant relativement proche (141/146 pb).

Tableau 37 : taille des fragments détectés

Souche	Toxines (taille produit, pb)	Taille de fragment détectée [pb]	
		Figure 11	Figure 12
A900322	SEG (95), I (148/149), M (149/151), N (149/151), O (149/159), P (121)	141/146	141/146
A900624	SEG, N, O, U2 (153), V (147)	141/146	100-113, 127, 141/146, >146
CCM5757	SEB (160), K (127), Q (113)	141/146	113-127, 127, 141/146, >146
FRI1151m	SED (119), J (159)	113, >146	141/146
FRI137	SEC (129), G, H (136), I, L (141), M, N, O, U (149)	113, 127, 141/146, >146	A : 141/46, >146 B : 141/146
FRI913	SEA (127), C, E (146), K, L, Q, R (160)	127, 141/146, >146	A : -, B : 127, 141/146, >146
Flukuoka 5	SEI, R, S (102), T	113, 127, >146	127
DSM1104	-	>146	-
DSM799	-	113, 127, 141/146	A : -, B : 113, 127-141, 141/146

Le nombre de fragments obtenus pour les souches de la figure 12 est plus élevé que pour la figure 11, cependant ces derniers, déterminés comme potentielles entérotoxines staphylococciques, sont de taille très similaire pour les deux gels. Les résultats obtenus, taille des fragments, sont approximatifs et peuvent correspondre à différents types de toxines. Pour *S. aureus* A900322 et A900624, les toxines potentielles détectées sont SEI respectivement SEN, O, U2, V, et pour *S. aureus* CCM5757 SEB, K, Q, pour les échantillons A et B. *S. aureus* FRI1151m, FRI137 et Flukuoka 5 possèdent plus de fragments pour les échantillons se trouvant dans le milieu de pré-culture, ces derniers peuvent correspondre à SED, J, SEC, H, I, L, M, N, O, U et SEI, R. Cependant, différents fragments ne correspondant pas aux toxines connues sont également présents, leur taille est de 141/146 pb pour *S. aureus* FRI1151m et de 113 pour *S. aureus* Flukuoka 5. *S. aureus* FRI913 possède les mêmes résultats pour les deux gels, les toxines présumées sont SEA, C, E, K, L, excepté pour l'échantillon A ou aucun fragment n'est présent. Pour *S. aureus* DSM1104 et 799, la présence de toxine n'est pas connue, cependant différents fragments ont été obtenus.

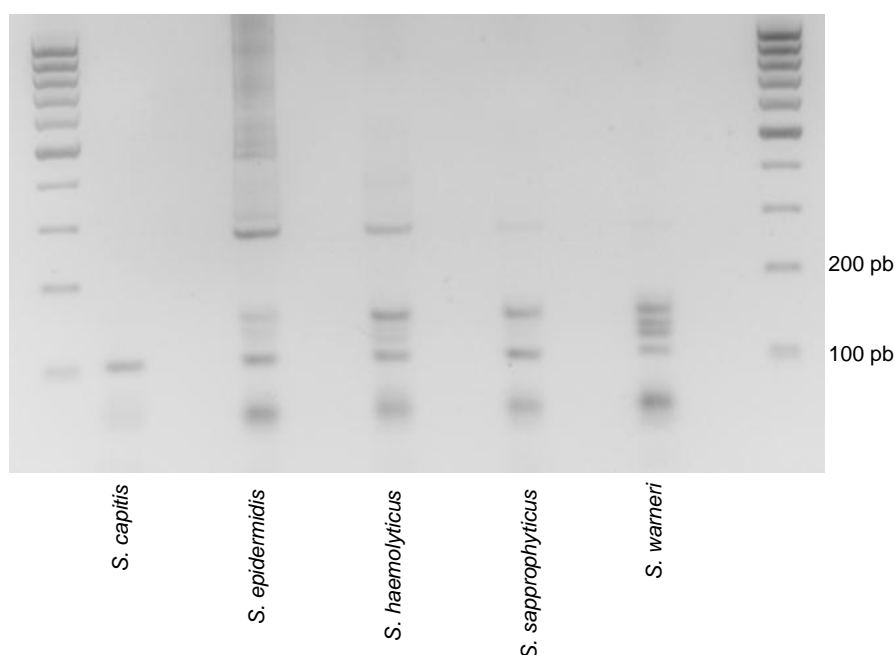


Figure 13 : souches de *S. non aureus* mises en croissance dans le milieu de pré-culture (TSB)

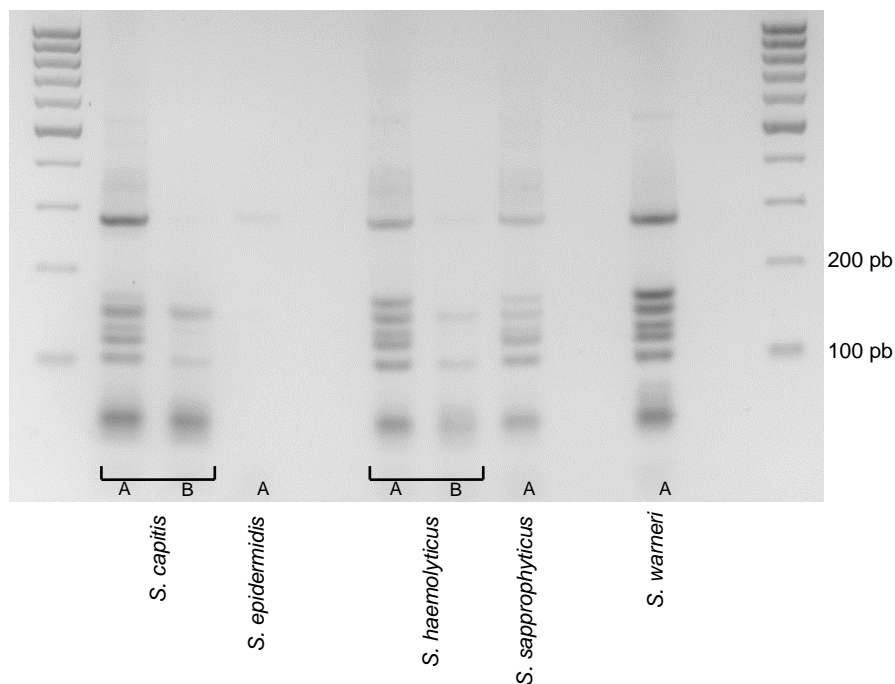


Figure 14 : souches de *S. non aureus* mises en croissance dans le milieu sélectif, avec (A) ou sans (B) matrice alimentaire

En ce qui concerne les souches de *S. non aureus*, la présence de toxines est détectée pour toutes les souches mises en croissance dans le milieu de pré-culture (TSB), excepté pour *S. capitis* (figure 13). Pour les souches mises en croissance dans le milieu sélectif, figure 14, les résultats ne sont pas similaires avec (A) ou sans (B) denrée alimentaire. Le nombre de fragments obtenus est plus élevé pour les échantillons A que B, excepté pour *S. epidermidis*. D'une manière générale, les résultats obtenus varient en fonction du milieu de croissance des souches et le nombre de fragments détectés est plus élevé pour les souches mises en croissance dans la matrice alimentaire et le milieu sélectif que dans les deux autres milieux.

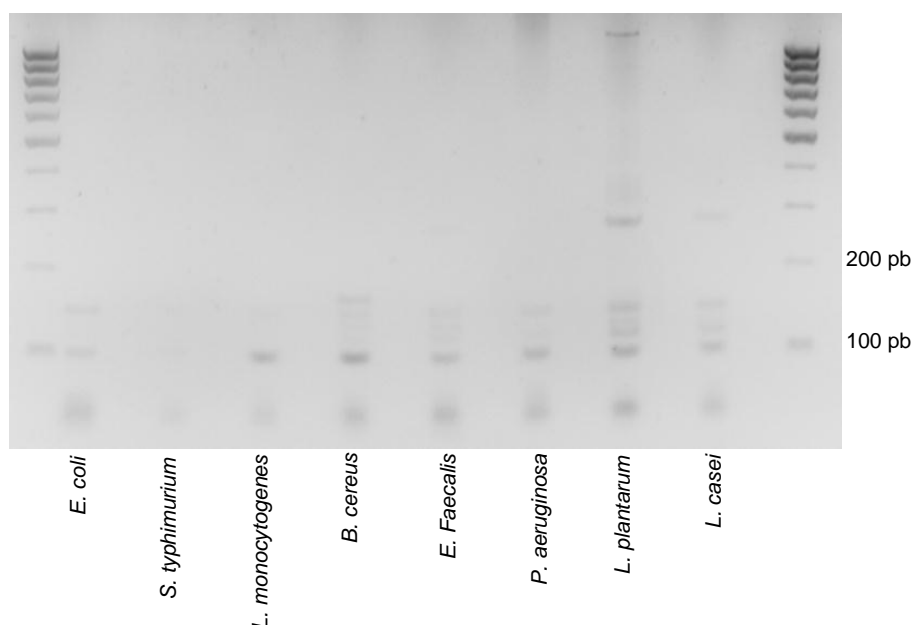


Figure 15 : souches de *S. non aureus* mises en croissance dans le milieu de pré-culture (TSB)

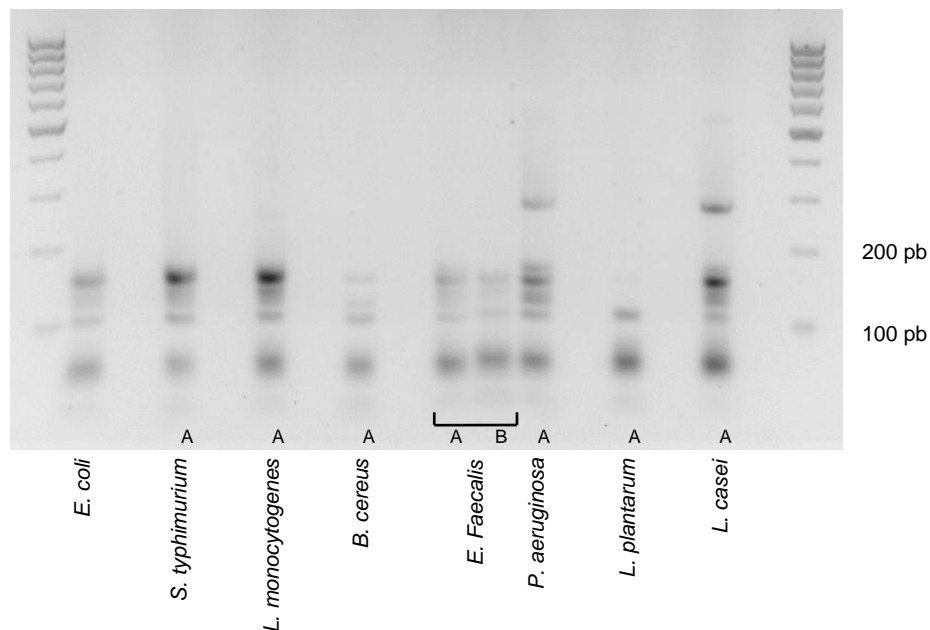


Figure 16 : souches de non *S. aureus* mises en croissance dans le milieu sélectif, avec (A) ou sans (B) matrice alimentaire

Les résultats obtenus pour les souches de non *S. aureus* avec le milieu de pré-culture se trouvent sur la figure 15, la présence de fragments de très faible intensité est observée. La figure 15 présente les différents résultats obtenus pour les souches mises en croissance avec la matrice alimentaire et le milieu sélectif, échantillons A. Un plus grand nombre de fragments est obtenu sur la figure 16 que sur la 15, excepté pour *E. faecalis* et *L. plantarum*. L'intensité de ces derniers est également plus forte. Pour *E. faecalis*, ce dernier a également été analysé après mise en croissance dans le milieu sélectif seul, les résultats obtenus pour les essais dans les autres milieux sont identiques mais d'intensité beaucoup plus élevée.

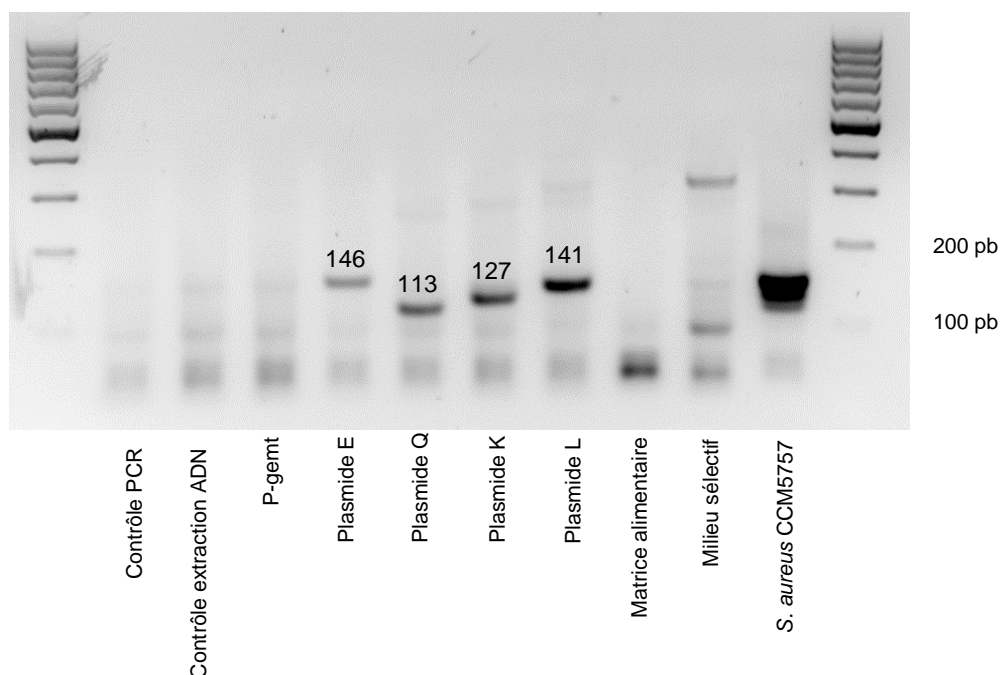


Figure 17 : contrôles effectués, après 1h10 de migration à 120V

Afin de pouvoir interpréter les différents résultats obtenus et vérifier que ces derniers soit fiables, différents contrôles ont été effectués. Excepté pour les plasmides et *S. aureus* CCM5757, les marques sur le gel sont de très faible intensité voire inexistantes. Les contrôles PCR et d'extraction d'ADN n'indiquent aucune contamination. En ce qui concerne la matrice et le milieu sélectif, il est possible de constater que ces derniers augmentent l'intensité des dimères d'amorces et des fragments son spécifiques.

3.7. Comparaison méthode avec real-time PCR (projet staphtox)

Lors de ce travail, les différentes souches analysées précédemment à l'aide la méthode PCR ont également été testées à l'aide de la méthode 2.2.8., utilisée lors du projet « Staphtox ». Une comparaison globale des différents résultats obtenus a été effectuée, ces derniers se trouvent en annexe 12.

D'une manière générale, il a été constaté que les différentes entérotoxines détectées pour les souches de *S. aureus* à l'aide de cette méthode ne sont pas identiques à celles déterminées lors de la PCR précédente, cependant elles sont fortement similaires, que ce soit pour les échantillons contenant les souches mises en croissance avec la denrée alimentaire dans le milieu sélectif ou TSB.

Une amélioration des résultats peut être observée pour les contrôles négatifs, souches de *S. non aureus* et non *S. aureus*. La présence de fragments est presque inexistante pour ces dernières en présence de denrée alimentaire et du milieu sélectif contrairement à la première PCR appliquée. En ce qui concerne le milieu TSB, la présence de très légers fragments est visible pour *S. non aureus* et aucun pour *S. aureus*, cependant les résultats obtenus sont identiques.

En comparant les résultats obtenus pour les deux PCR, il est possible de constater que la présence de dimères d'amorces est beaucoup plus importante.

4. Discussion

4.1. Sélection de la matrice alimentaire et des souches utilisées lors de ce travail

La sélection des souches non *S. aureus* a été effectuée de manière globale pour les deux matrices alimentaires et principalement pour le lait cru. Ce choix a été effectué dans le but de procéder également à l'analyse d'un fromage à pâte molle à base de lait cru lors de ce travail, cependant uniquement la crème vanille a été utilisée. Les souches utilisées ne sont pas spécifiques à la matrice alimentaire, cependant uniquement cette dernière peut être un aliment à risque pour *B. cereus* et la présence d'*E. coli* peut être due à de mauvaises conditions d'hygiène lors de la production de ce dernier [18]. *E. faecalis* peut être dû à une contamination fécale. [19]

En ce qui concerne la possible présence de *S. aureus* dans la matrice alimentaire, cette dernière peut être due à une contamination d'origine humaine lors de la manipulation des produits pendant la production de ces derniers. Cependant, il est nécessaire que la croissance de *S. aureus* soit assez importante pour produire des toxines. La crème dessert vanille, principalement composée de lait et de crème, présente un milieu de croissance favorable à la croissance de *S. aureus*, principalement dû à la présence de protéines [3] et de saccharose [20]. De plus, le produit étant pasteurisé, la croissance de *S. aureus* n'est pas limitée par la présence d'une flore compétitive.

4.2. Sélection du milieu d'enrichissement sélectif et optimal à la croissance de *Staphylococcus aureus*

L'utilisation d'un milieu d'enrichissement pour la croissance de *S. aureus* est la première étape effectuée dans le but d'améliorer la spécificité de la méthode PCR finale. Ce dernier est employé afin d'inhiber la croissance des souches de non *S. aureus* et d'obtenir ainsi une quantité d'ADN faible lors de l'étape d'extraction d'ADN avec la lysostaphine et inversement pour les souches de *S. aureus*.

Le milieu d'enrichissement sélectionné doit être sélectif et optimal à la croissance de *S. aureus*. Ce dernier pouvant croître jusqu'à une concentration de 15% en NaCl, la sélectivité du milieu est obtenue par le sel. Dans un premier temps, deux milieux ont été testés, Buttiaux Brogniart et TSB + 10% de NaCl. D'une manière générale, ces milieux permettent d'inhiber la croissance des bactéries non *S. aureus*, ce qui peut être expliquées par leur tolérance plus faible au NaCl que *S. aureus*, *S. typhimurium* (8% NaCl), *B. cereus* (5-10%), *E. coli* (6-8%) [14] et *L. monocytogenes* (12%) [21]. En ce qui concerne *E. faecalis*, le milieu TSB + 10 % NaCl ne permet pas d'inhiber sa croissance, contrairement au milieu Buttiaux Brogniart, mais offre des conditions de croissance optimale à *S. aureus*. Aucun de ces milieux n'est optimal et sélectif. Dans un deuxième temps, le milieu TSB + 15% NaCl présenté comme une alternative aux deux autres, est également testé. Ce dernier permet d'avoir des conditions de croissance optimales pour *S. aureus* et d'inhiber la croissance d'*E. faecalis*. Les autres souches de non *S. aureus* sont également considérées comme inhibées étant donné les résultats obtenus pour le milieu TSB avec 5% de sel en moins.

L'utilisation du milieu Tryptic Soy Broth avec l'adjonction de NaCl 15% (150g/l) permet d'obtenir un milieu sélectif et optimal à la croissance de *S. aureus*. Cependant, l'utilisation de haute teneur en sel comme facteur de sélectivité peut être discuté. En effet, lors de la détection d'un faible nombre de *S. aureus* (<100 ufc/g), ce dernier peut conduire à l'inhibition des cellules comportant des lésions sublétales (cellules stressées) pour une concentration de > 40g/l en NaCl [17].

Lors de ce travail, la croissance des souches de *S. aureus* obtenues avec 15% (150g/l) de NaCl est optimale, cependant le nombre de germesensemencés est d'environ 1'000 ufc/g. Il serait donc important de vérifier cette dernière avec un nombre de germes initial inférieur à 100 ufc/g. L'addition de pyruvate de sodium 1% au milieu d'enrichissement peut également être envisagée pour diminuer l'inhibition des cellules stressées. Il serait également intéressant de tester les milieux écartés lors des recherches de littérature, Giolitti et Cantoni et BP liquide, n'utilisant pas le sel comme facteur de sélectivité, cf. annexe 13. Cependant, ces derniers sont faiblement sélectifs à la croissance de *S. aureus*.

4.3. Croissance des souches dans le milieu d'enrichissement sélectif

La totalité des souches a été mise en croissance dans le milieu sélectif TSB + 15% NaCl avec et sans matrice alimentaire afin de pouvoir évaluer le degré de sélectivité de ce dernier.

Lors de la croissance des souches dans le milieu sélectif TSB + 15% NaCl en présence de la matrice alimentaire, les différentes souches de *S. aureus* et *S. non aureus* croissent de manière optimale. Pour *S. aureus*, excepté pour A900322, FRI1151m et FRI137, la croissance minimale obtenue est de $1 \cdot 10^8$ ufc/g et pour *S. non aureus* de $1.6 \cdot 10^6$ ufc/g. D'une manière général, le milieu est plus optimal pour la croissance des *S. aureus* que *S. non aureus*.

En ce qui concerne les souches de non *S. aureus*, le milieu sélectif utilisé permet d'inhiber leur croissance, excepté pour *E. faecalis* et *L. monocytogenes*. La croissance de *L. monocytogenes* peut être expliquée par sa haute tolérance au sel, développement jusqu'à 12% NaCl. Cependant, en ce qui concerne *E. faecalis*, capable de croître jusqu'à 6.5 % NaCl ^[22], le milieu devrait être inhibé, cependant une croissance de $2.5 \cdot 10^8$ ufc/g est observée.

Différentes souches ont également été mises en croissance dans le milieu sélectif seul, *S. aureus* CCM5757, FRI137 et 913, DSM799, *S. capitis* et *haemolyticus* et *E. faecalis*. A l'aide de ces dernières, il est possible de constater que la tendance de croissance est similaire aux échantillons comportant la denrée alimentaire, une augmentation du nombre de germes est observée, excepté pour *E. faecalis*. Etant donné les résultats similaires obtenus pour les autres souches avec et sans denrée alimentaire, la croissance d'*E. faecalis* dans le milieu sélectif et la denrée alimentaire a été répétée deux fois. Une réduction du nombre de germes a été observée lors des deux essais, la croissance d'*E. faecalis* est donc considérée comme inhibée dans le milieu sélectif.

D'une manière générale, il est possible de constater que le milieu sélectionné permet une inhibition des souches non *S. aureus*, excepté pour *L. monocytogenes*, et une croissance optimale aux staphylocoques. En fonction des différents résultats obtenus pour *E. faecalis*, la reproductibilité de la méthode utilisée pour la croissance des différentes souches peut être mise en doute. Cette dernière a été effectuée dans un tube à essais avec 9 ml de milieu d'enrichissement et 1 g de matrice alimentaire sans agitation, le manque de reproductibilité peut être expliqué par une mauvaise homogénéisation de l'échantillon. Cependant, la croissance des souches n'a été effectuée qu'une fois, il serait donc nécessaire de procéder à plus d'essais afin de déterminer les limites de la méthode. L'utilisation d'un milieu de culture de volume plus élevé et une mise sous agitation constante de ce dernier lors de la croissance des souches peut être envisagé afin d'augmenter la reproductibilité de la méthode.

4.4. Extraction d'ADN avec la lysostaphine

L'étape d'extraction d'ADN à l'aide de la lysostaphine, tout comme l'utilisation d'un milieu d'enrichissement sélectif et optimal à *S. aureus* lors de la croissance des souches, est effectuée en vue d'améliorer la spécificité de la méthode PCR pour la détection des toxines de *S. aureus*.

L'utilisation de la lysostaphine doit permettre d'extraire une quantité d'ADN plus importante pour les souches de *S. aureus* que pour les autres. En effet, cette dernière est une enzyme qui permet de lyser la cellule en clivant spécifiquement le peptidoglycane de *S. aureus* ^[23].

Lors de ce travail, l'action de la lysostaphine ne peut pas réellement être démontrée. Contrairement aux résultats attendus, la quantité d'ADN obtenue pour les souches de non *S. aureus* mises en croissance dans le milieu de pré-culture (TSB) est globalement plus élevée que pour les Staphylocoques, pour un nombre de germes similaires. En ce qui concerne les souches mises en croissance dans le milieu sélectif avec la denrée alimentaire, la quantité d'ADN obtenue pour les Staphylocoques est supérieure aux souches de non *S. aureus*, contrairement au milieu TSB. Ces résultats peuvent être expliqués en mettant en corrélation la quantité d'ADN extraite et le nombre de germes présents lors de l'extraction. D'une manière globale, la quantité d'ADN peut être quantifiée pour un nombre de germes $\geq 1.6 \cdot 10^8$ ufc/g et est < 0.010 µg/ml pour un nombre de germes $< 4.5 \cdot 10^5$ ufc/g.

La quantité d'ADN extraite est donc influencée par le nombre de germes présents. L'utilisation du milieu sélectif TSB + 15% NaCl, inhibant la croissance des souches de non *S. aureus*, permet de

diminuer la quantité d'ADN obtenue lors de l'étape d'extraction. Cependant, l'influence de la lysostaphine ne peut pas être vérifiée. Il serait intéressant de procéder à des essais supplémentaires afin de confirmer les résultats obtenus.

4.5. Sélection d'une méthode PCR pour la détection des entérotoxines staphylococciques

La méthode PCR à déterminer doit permettre de détecter les gènes des 21 entérotoxines staphylococciques connues en une seule réaction (multiplex PCR), en présence de denrée alimentaire. Cette dernière est effectuée à l'aide des 49 amorces nécessaires à l'amplification des séquences cibles de chaque toxine (multiplex PCR).

Dans un premier temps, une méthode PCR de base, condition de cycles et composition du master mix, a été fixée en fonction de l'enzyme utilisé. Au vu des résultats des figures 2 et 4, l'enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase a été sélectionnée pour les analyses PCR. Ce dernier permet d'obtenir des résultats nets, exempts de grands fragments et de dimères d'amorces, contrairement à l'enzyme 2x KAPA 2G Fast Ready Mix. Les dimères d'amorces pouvant être amplifiés efficacement et entrer en compétition avec l'amplification de la séquence cible lors de la PCR ^[12], leur formation doit être évitée. Dans un deuxième temps, la méthode PCR sélectionnée a été optimisée.

Lors de l'optimisation de la méthode PCR de base, cette dernière a été réitérée et les résultats obtenus ne sont nullement similaires à ceux obtenus précédemment, dans les mêmes conditions. La formation de grands fragments et de dimères est à nouveau présente sur le gel et le nombre de fragments détectés pour les échantillons contenant *S. aureus* n'est pas identique. Ces derniers peuvent être le résultat d'une erreur lors du choix de l'enzyme employé. En effet, ce dernier existe sous deux formes, Phire® Hot Start II DNA Polymerase et Phire® Hot Start I DNA Polymerase, cette dernière possédant une activité plus faible. Au vu des résultats obtenus, il est possible d'envisager que la mauvaise enzyme, Phire® Hot Start I DNA Polymerase a pu être utilisée lors de la détermination de la méthode PCR de base.

Les différents essais d'optimisation ont été effectués dans le but de minimiser les interactions non spécifiques lors de la PCR, éviter la formation de grands fragments et de dimères d'amorces. L'interprétation des résultats a principalement été effectuée en fonction des critères ci-dessus et à l'aide des plasmides utilisés contenant les gènes isolés des différentes toxines, permettant d'obtenir un fragment net sur le gel d'agarose. L'utilisation d'échantillons contenant des souches de *S. aureus* et non *S. aureus* a également été effectuée, cependant les résultats de ces derniers n'ont pas été discutés pour les différents essais d'optimisation, étant donné que les résultats obtenus sont identiques.

Dans un premier temps, l'action du DMSO, additif utilisé pour optimiser la PCR, a été étudié. Ce dernier est connu pour améliorer la séparation des brins d'ADN, éviter l'appariement non spécifique des amorces et ainsi d'éviter la formation de structure secondaire ^[24]. Cependant, en fonction de la concentration utilisée, le DMSO peut également inhiber la réaction PCR. La concentration recommandée de ce dernier est généralement de 1 à 10%, cependant lors de son utilisation dans une multiplex PCR, des résultats contradictoires ont été démontré ^[25]. Le DMSO étant présent dans le master mix de la PCR de base (3%), un essai a donc été effectué sans ce dernier afin de déterminer l'influence du DMSO lors de la réaction PCR. En fonction des résultats obtenus, il est possible de constater que l'utilisation de DMSO résulte en une présence plus forte des grands fragments et des dimères formés lors de la PCR. Le DMSO peut également modifier le profil d'activité thermique de l'ADN polymérase ainsi que la température d'hybridation (T_m) ^[26], cette dernière diminue de 5.5-6°C pour une addition de 10% de DMSO ^[27]. En fonction de ces informations, les essais PCR avec 0 et 3% de DMSO ont également été effectués en diminuant la température d'hybridation de 2°C. A l'aide des résultats obtenus, l'utilisation de DMSO couplée à une diminution de la température n'apporte aucune amélioration à la réaction PCR. Au contraire, la présence des grands fragments et des dimères est plus marquée sur le gel et une apparition de produits non spécifiques pour les échantillons contenant les plasmides peut être observée. En ce qui concerne les résultats obtenus pour la PCR sans DMSO, ces derniers sont similaires pour la PCR avec 3% de DMSO.

En fonction des différents essais réalisés, la présence de DMSO dans la réaction PCR ne semble pas adaptée. Aucune amélioration de la multiplex PCR n'étant constatée, le DMSO est donc éliminé.

Dans un deuxième temps, la PCR a été effectuée en éliminant l'étape d'extension, 1sec à 72°C. A l'aide des résultats de cette dernière, il est possible d'observer une amélioration de la méthode. La présence de grands fragments et de dimères est diminuée, voir éliminée pour les échantillons contenant les plasmides. Les fragments obtenus pour les différents échantillons analysés sont également plus nets et présentent une meilleure séparation que pour la PCR avec étape d'extension. Cette dernière est donc supprimée des cycles de la PCR.

L'élimination du DMSO et de l'étape d'extension de la PCR permettent de diminuer la présence de grands fragments et de dimères d'amorces mais pas de les éliminer. Cette méthode nécessite donc d'être optimisée. Afin d'éviter la formation des dimères d'amorces, il serait nécessaire de procéder à l'optimisation du rapport entre la concentration des différentes amorces et de l'échantillon d'ADN utilisé ^[28] ainsi qu'à l'augmentation de la spécificité des amorces ^[12].

La formation des dimères d'amorces étant due à l'appariement des amorces possédant des séquences complémentaires ^[29], il est également important de noter que l'utilisation de plus d'une paire d'amorces lors de la PCR augmente la probabilité d'obtenir une formation de dimères d'amorces ^[28]. Une diminution du nombre d'amorces doit être envisagée.

4.6. Détection des entérotoxines staphylococciques

Une fois la méthode PCR pour la détection des gènes des 21 entérotoxines staphylococciques dans une matrice alimentaire sélectionnée, cette dernière a été testée à l'aide de différentes souches connues pour contenir des toxines, *S. aureus*. L'utilisation de souches ne produisant pas de toxines, *S. non aureus* et non *S. aureus* permet de vérifier la sélectivité de la méthode.

Lors de ce travail, la séquence d'ADN à amplifier étant définie pour chaque entérotoxine staphylococcique à l'aide d'amorces, ces dernières permettent d'obtenir des produits PCR de taille définie pour chacune des 21 entérotoxines, entre 100 et 200 pb. Au vu des résultats obtenus pour les souches de *S. aureus*, la détection de la présence des toxines peut être effectuée à l'aide de la PCR sélectionnée, cependant ces dernières peuvent difficilement être identifiées de manière exacte. En effet, en fonction des résultats du tableau 37, il est possible de constater que le nombre de toxines détectées est inférieur au nombre de toxines connues de chaque souche. Ces résultats peuvent être expliqués par la concentration des amorces utilisés lors de la PCR, ces dernières étant en quantité équimolaire. En effet, lors de l'amplification de différents fragments d'ADN simultanément, certaines séquences étant amplifiées plus efficacement vont influencer négativement le rendement des produits obtenus pour les séquences amplifiées moins efficacement ^[30]. Il serait donc nécessaire d'adapter la concentration de chaque paire d'amorces utilisées.

En fonction des résultats obtenus pour les différentes souches de *S. aureus*, excepté DSM799 et DSM1104, il est possible de constater que la détection des toxines peut être influencée par la présence de la denrée alimentaire. En effet, les résultats obtenus pour les souches mises en croissance dans le milieu TSB + 15%, ne sont pas identiques avec ou sans la denrée alimentaire, le nombre et l'intensité des fragments obtenus varient. D'une manière générale, le nombre de toxines détecté est supérieur pour les échantillons contenant la denrée alimentaire. En comparant les produits PCR des souches mises en croissance dans le milieu TSB + 15 % de NaCl à celle dans le milieu TSB seul, il est également possible de constater une différence de résultats. Le nombre de fragments obtenus lors des analyses PCR, est supérieur pour le milieu TSB avec 15 % de sel. Cependant, la quantité d'ADN étant relativement élevée lors des analyses PCR avec le milieu TSB, les fragments obtenus sur le gel sont beaucoup plus denses, certains d'entre eux peuvent ne pas être visibles. Afin de vérifier que les fragments supplémentaires obtenus ne proviennent pas de la matrice alimentaire et du milieu sélectif en lui-même, ces derniers ont également été testés. Aucune présence de fragments n'étant observée, la présence de sel et de la matrice alimentaire semble améliorer la détection de toxines. Cependant, la sélectivité de la méthode peut être mise en doute. En effet, lors de l'analyse de souche de *S. aureus* ne possédant pas de toxines, DSM799 et DSM1104, la présence de fragments a pu être observée.

La sélectivité de la méthode a été vérifiée à l'aide de souches n'étant pas connues pour contenir des toxines, des staphylocoques à coagulase négative et des souches de non *S. aureus*. A l'aide de ces derniers, la fiabilité de la méthode PCR pour la détection des gènes des 21 entérotoxines staphylococciques dans une matrice alimentaire a pu être observée.

En ce qui concerne les staphylocoques à coagulase négative, la PCR a permis de mettre en évidence la présence de toxines dans les échantillons contenant la matrice alimentaire et le milieu TSB + 15% de NaCl, excepté pour *S. epidermidis*. En comparaison avec le milieu sélectif seul, la présence de la denrée alimentaire augmente le nombre et l'intensité des fragments obtenus.

L'analyse des souches dans le milieu TSB permet de détecter la présence de toxines, excepté pour *S. capitis*. Selon certains auteurs, mais ceci reste à prouver, différentes souches de staphylocoques à coagulase négative peuvent produire des entérotoxines staphylococciques^[7] et celles utilisées lors de ce travail en font partie, excepté pour *S. capitis*. Les résultats obtenus pour la détection de toxines à l'aide d'une souche pure semblent correspondre à la littérature. La détection de toxines pour *S. capitis* en présence de la denrée alimentaire permet donc d'envisager que cette dernière influence la réaction PCR de manière négative et non de manière positive comme envisagé pour les souches de *S. aureus*.

A l'aide des résultats obtenus pour les souches de non *S. aureus*, l'hypothèse précédente peut être renforcée. De nombreux fragments peuvent être observés en présence de la denrée alimentaire et du milieu TSB + 15% mais également avec le milieu seul, cependant d'intensité plus faible. Ces résultats sont opposés à ceux obtenus à l'aide du milieu TSB, où la présence de fragments est presque inexistante. L'utilisation de souches non *S. aureus* ne produisant pas d'entérotoxines staphylococciques, la détection de ces dernières lors des analyses effectuées avec l'échantillon contenant la matrice alimentaire et le sel, peut laisser envisager que la présence de ces derniers permet la formation de produits non spécifiques. De plus, il est possible de constater qu'un grand nombre de fragments obtenus en présence de denrée alimentaire est similaire pour les différentes souches.

En résumé, à l'aide des différents résultats obtenus lors de ce travail, il est possible de constater que la matrice alimentaire utilisée lors de la croissance des souches ainsi que le milieu nécessaire à cette dernière ont une influence négative lors de l'analyse PCR, présence de faux positifs. Cependant, ces résultats sont difficilement explicables, les matrices alimentaires étant connues comme inhibiteur de la PCR résultant en la présence de faux négatif. Lors de ce travail, il a également été remarqué que la méthode PCR semble adaptée à la détection des toxines de *S. aureus* dans les souches sans denrée alimentaire.

Afin de diminuer l'influence de la matrice alimentaire lors de l'analyse PCR, il est nécessaire d'optimiser l'étape d'extraction d'ADN. En effet, lors de ce travail, l'extraction d'ADN a été effectuée en fonction d'un protocole prévu pour des souches de bactéries pures, NucleoSpin Tissue. Les résultats obtenus pour les échantillons contenant la matrice alimentaire, cf. point 3.3., démontrent que l'extraction d'ADN est possible à l'aide du protocole appliqué. Cependant, l'utilisation d'une méthode spécifique à l'extraction d'ADN dans les aliments doit être envisagée, tel que NucleoSpin Food, afin d'obtenir une purification optimale de l'ADN utilisé lors de la PCR et ainsi diminuer l'influence de la denrée alimentaire lors de la PCR.

En ce qui concerne la diminution de l'influence du sel, en plus de modifier la méthode d'extraction d'ADN, le changement du milieu sélectif (TSB + 15% NaCl) utilisé lors de la croissance des souches pour un milieu contenant une concentration plus basse en NaCl, peut également être envisagée, cf. point 3.2.

En fonction des résultats obtenus à l'aide de la real-time PCR, il est possible de constater que les différentes toxines détectées pour *S. aureus* sont très similaires à celle de la multiplex PCR, cependant malgré la présence de dimères d'amorce très forte, la présence de faux positif dans les souches de non *S. aureus* est beaucoup plus faible. L'optimisation des conditions de cycles et de la composition du master mix de la real-time PCR semble également être une alternative afin de pouvoir détecter les entérotoxines staphylococciques dans une matrice alimentaire.

5. Conclusion et perspectives

Lors de ce travail, la mise au point d'une multiplex PCR permettant la détection simultanée des 21 entérotoxines staphylococciques dans une denrée alimentaire n'a pas été concluante, cependant différents constats ont pu être effectués sur les étapes précédant la PCR afin d'en augmenter la sélectivité.

L'utilisation du milieu d'enrichissement TSB + 15 % NaCl, précédant l'extraction d'ADN, permet une croissance optimale des staphylocoques et inversement, permet d'inhiber la croissance des souches non *Staphylococcus*. Cependant, une haute teneur en sel peut avoir des effets négatifs sur la récupération de cellules stressées. L'utilisation d'un milieu d'enrichissement possédant un facteur de sélectivité autre que le NaCl, tels que Giolitti et Cantoni et PB liquide pourrait être testée.

En ce qui concerne l'extraction d'ADN, l'utilisation de lysostaphine n'a pas permis d'améliorer la sélectivité de la méthode à *S. aureus*. La quantité d'ADN extraite pour les différentes souches staphylococciques ou non est identique pour un nombre de germes similaire. Cependant, en présence du milieu sélectif, la croissance des souches non *Staphylococcus* étant inhibées par ce dernier, la diminution du nombre de germes permet l'obtention d'une quantité d'ADN plus faible que pour les staphylocoques. La sélectivité de la méthode d'extraction est donc influencée par le nombre de germes, cependant il serait nécessaire de procéder à des essais supplémentaires afin de pouvoir évaluer l'effet de la lysostaphine. Une augmentation de la concentration en lysostaphine peut être envisagée.

La PCR sélectionnée a été effectuée à l'aide de l'enzyme Phire® Hot Start II DNA Polymerase et des 49 amorces codant les différentes entérotoxines. Ces dernières ont pu être détectées mais très difficilement identifiées, les produits obtenus par les amorces ne possédant pas tous des fragments de taille distincte. Cette méthode semble être adaptée pour la détection de toxines dans une souche pure, malgré la formation de dimères d'amorces < 100 pb et de grands fragments > 200 pb qui n'ont pu être éliminés. De plus, la présence de la denrée alimentaire et du milieu sélectif avec 15 % de NaCl provoquent la formation de produits non spécifiques et des résultats faux positifs. Les résultats obtenus pour la détection de toxines en présence de la denrée alimentaire et du milieu sélectif peuvent donc être fortement mis en doute.

La matrice alimentaire étant de la crème dessert vanille, il serait également intéressant de tester la méthode avec d'autres matrices alimentaires mais également avec une méthode d'extraction d'ADN spécifique pour les aliments, telle que le kit d'extraction NucleoSpin Food et non NucleoSpin Tissue, afin de vérifier et diminuer l'influence de la matrice alimentaire sur la réaction PCR. En ce qui concerne la présence des dimères d'amorces, il serait nécessaire de procéder à une optimisation de la sélectivité des amorces. Cette dernière peut être envisagée à l'aide du logiciel Blast, dans le but de pouvoir diminuer le nombre d'amorces utilisées. Un changement d'enzyme, moins actif, peut également être envisagé afin de diminuer la formation de grands fragments. La réaction PCR peut également être envisagée à l'aide de la méthode utilisée lors du projet « Staphtox » : la PCR en temps réel sans sonde de fluorescence. Il faudrait alors l'optimiser.

D'une manière générale, la détection simultanée de toutes les entérotoxines staphylococciques dans une matrice alimentaire est difficile, cette dernière fausse les résultats. La formation de dimères d'amorces et de grands fragments ne peut être évitée lors de la réaction PCR. La méthode PCR nécessite donc d'être optimisée ainsi que l'étape d'extraction d'ADN et de la croissance des souches.

6. Remerciements

Je remercie les personnes qui m'ont aidée, m'ont soutenue et conseillée dans la réalisation de ce travail.

Leur disponibilité, leurs conseils et leurs compétences m'ont été précieux.

Merci donc :

- Au Dr Sarah Wegmüller
- Au Dr Bruno Schnyder
- A Monsieur Bruno Lehner
- Et à toute l'équipe des laboratoires de microbiologie et de biologie moléculaire

7. Bibliographie

- [1] K. S. Seo et Bohach G. A, Staphylococcal Food Poisoning, Pathogens and Toxins in Foods, V. K. Juneja et J. N. Sofos (Ed.), ASM Press, Washington, (2010), 119-130
- [2] *Staphylococcus aureus*, Food Microbiology: an Introduction, Montville T. J., Matthews K. R., ASM Press, Washington, (2008), 189-201
- [3] Lacasse D., Introduction à la Microbiologie alimentaire, Editions Saint-Martin, Montréal, (1995), 484-487, (2001), 63-76
- [4] Office fédéral de la santé publique, Foyer de toxi-infections alimentaires en Suisse de 1994 à 2006, bulletin 32, (2008), 562-568
- [5] Johler S. et Stephan R., Pathogene Mikroorganismen, *Staphylococcus aureus*, Infektions- und Intoxikationserreger, Behr's Verlag, (2010), 35-79
- [6] *Staphylococcus aureus* and food poisoning, Le Loir Y., Baron F., Gautier M., Genetic and Molecular Research, 2(1), (2003), 63-76
- [7] Hennekinne J.-A., Nouvelles approches pour la caractérisation des toxi-infections alimentaires à staphylocoques à coagulase positive, thèse, (2009), 19-67
- [8] Bessetti J., An Introduction to PCR Inhibitors, Profiles in DNA, Promega Corporation, (2007), 9-10
- [9] Bickley J., Hopkins D., Inhibitors and Enhancer of PCR, Analytical Molecular Biology, Quality and Validation, Saunders G. C., Parkes H. C. (Ed.), LGC Ltd, Teddington, (1999), 81-102
- [10] Branger A., Richer M. M et Roustel S., Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques, Editions educagri, Dijon, (2007), 116-120
- [11] Reece R. J., Analysis of Genes and Genomes, John Wiley & Sons, Ltd, England, (2004), 153-182 gène and génome
- [12] Zangenberg G., Saiki R. K., Reynolds R., Multiplex PCR : optimization guidelines, PCR Applications, Protocols for functional genomics, Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. (ed.), Academic Press, (1999), 73-93
- [13] Wegmüller S., Staphtox 1-19 (21614), Final report (draft), HES·SO, 2010
- [14] Hahn G., Pathogenic bacteria in raw milk – situation and significance, Bacteriological quality of raw milk, International Dairy Federation, Belgium (1996), 67-83
- [15] Richard J., La flore microbienne du lait cru, influence des conditions de traite, Le lait matière première de l'industrie laitière, INRA-CEPIL, Paris, (1987), 187-191
- [16] Tourneur C., Les bactéries psychrotrophes : taxonomie, caractères physiologiques, potentiel biochimique, Le lait matière première de l'industrie laitière, INRA-CEPIL, Paris, (1987), 193-200
- [17] Baird R. M. et Lee W. H., Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*, International Journal of Food Microbiology, 26, (1995), 15-24

-
- [18] Quittet C., Nellis H., HACCP pour PME et artisans, Secteur produits laitiers, les Presses agronomiques de Gembloux, Gembloux, (1999), 345-351
- [19] Bonnefoy C. et al., Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires, doin éditeur, 2002, 105
- [20] Genigeorgis C. A., Present state of knowledge on staphylococcal intoxication, International Journal of Food Microbiology, 9, 327-360
- [21] Branger A., Richer M. M et Roustel S., Microbiochimie et alimentation, Editions educagri, Dijon, (2007), 84-85
- [22] Hancock L. E., Gilmore M. S., Pathogenicity of Enterococci, Gram-positive Pathogens, ASM Press, Washington, (2010), 299-306
- [23] Francius G. et al., Direct Observation of *Staphylococcus aureus* Cell Wall Digestion by Lysostaphine, Journal of bacteriology, 190, (2008), 7904-7909
- [24] Schubert M., Hloch B., Rüger B., Step-by-step Protocol for Multiplex PCR with the FastStart, High Fidelity PCR System and the PCR Optimization Kit, Amplification Technical Note, Roche Applied Science, Germany, (2009), 5
- [25] Henegariu O. et al., Multiplex PCR : Critical Parameters and Step-by-Step Protocol, Research Reports, BioTechniques, 23, (1997), 504-511
- [26] Bartlett J. M. S et Stirling D., Optimization of Polymerase Chain Reactions, Methods in Molecular biology, PCR Protocols, 226, Humana Press Inc., Totowa, (2009), 89-99
- [27] Phire® Hot Start II DNA Polymerase, Fiche technique, FINNZYMES, 2010
- [28] Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M., Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach, Journal of Clinical Laboratory Analysis, 16, (2002), 47–51
- [29] MacPherson M. J., Moller S. G., Optimization of PCR, PCR, The basics from backgroud to bench, BIOS Scientific Publishers, (2000), 71-90
- [30] Valle J. et al., Enterotoxin Production by Staphylococci Isolated from Healthy Goats, Applied and Environmental Microbiology, 56, (1990), 1323-1326

ANNEXES

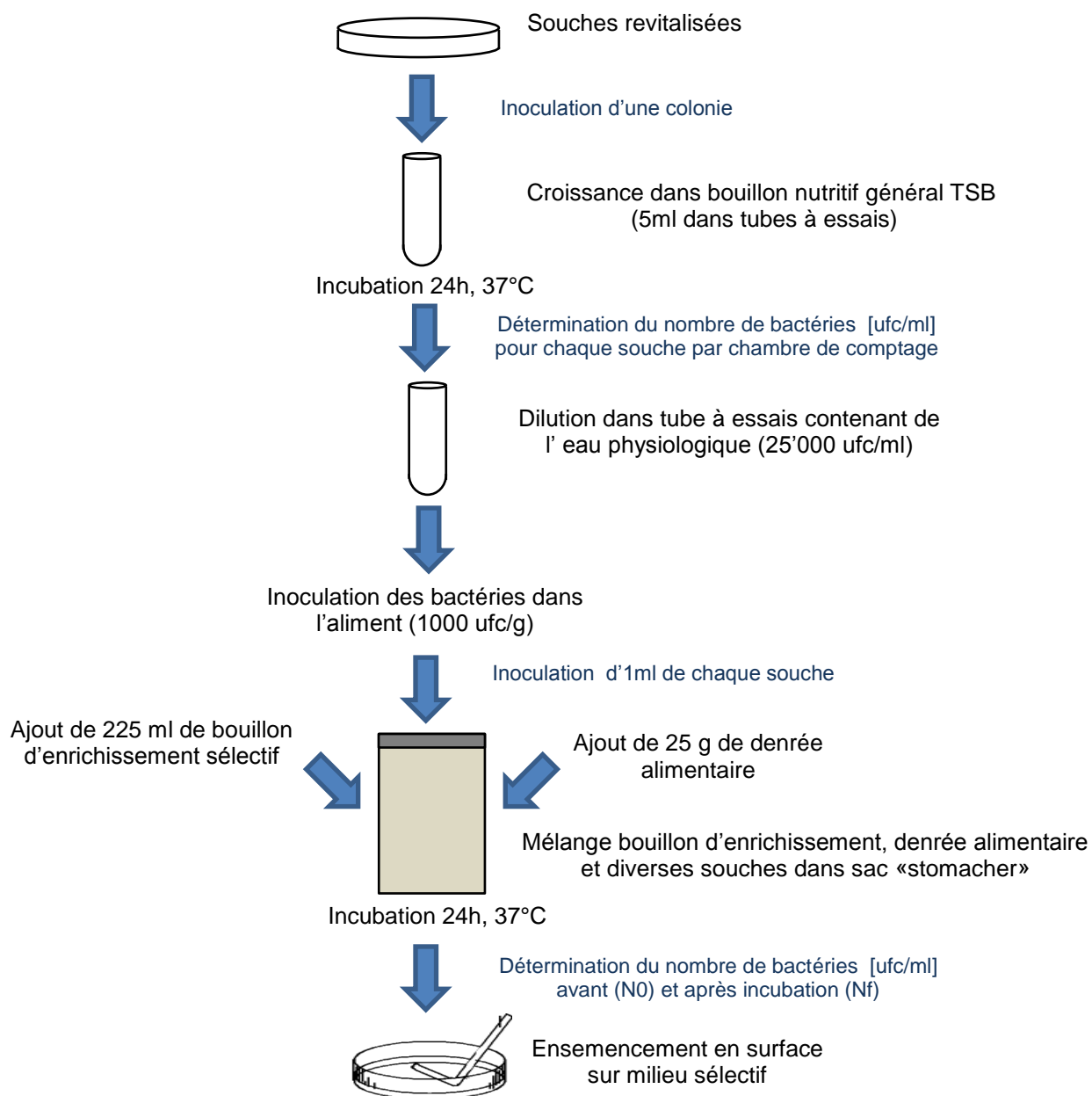
- 1 – Références détaillées pour les différentes amorces utilisées lors de ce travail
- 2 – Sélection du milieu d'enrichissement sélectif pour *Staphylococcus aureus*
- 3 – Croissance des souches dans le milieu d'enrichissement sélectif
- 4 – Protocole « Genomic DNA Purification from tissue »
- 5 – Protocole « Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kits »
- 6 – Séquences des toxines (SEA à SEV)
- 7 – Quantité d'ADN utilisée pour les différentes souches lors des essais
- 8 – Caractérisation de la denrée alimentaire utilisée
- 9 – Nombre de germes initial et final pour les différentes souches après croissance dans le milieu sélectif
- 10 – Quantité d'ADN extraite en fonction du nombre de germes présents lors de l'extraction
- 11 – Résultats pour l'optimisation de la PCR avec la bétaine
- 12 – Résultats obtenus pour la real-time PCR
- 13 – Facteur de sélectivité des milieux d'enrichissement sélectif à *S. aureus*

Annexe 1 : références détaillées pour les différentes amorces utilisées lors de ce travail

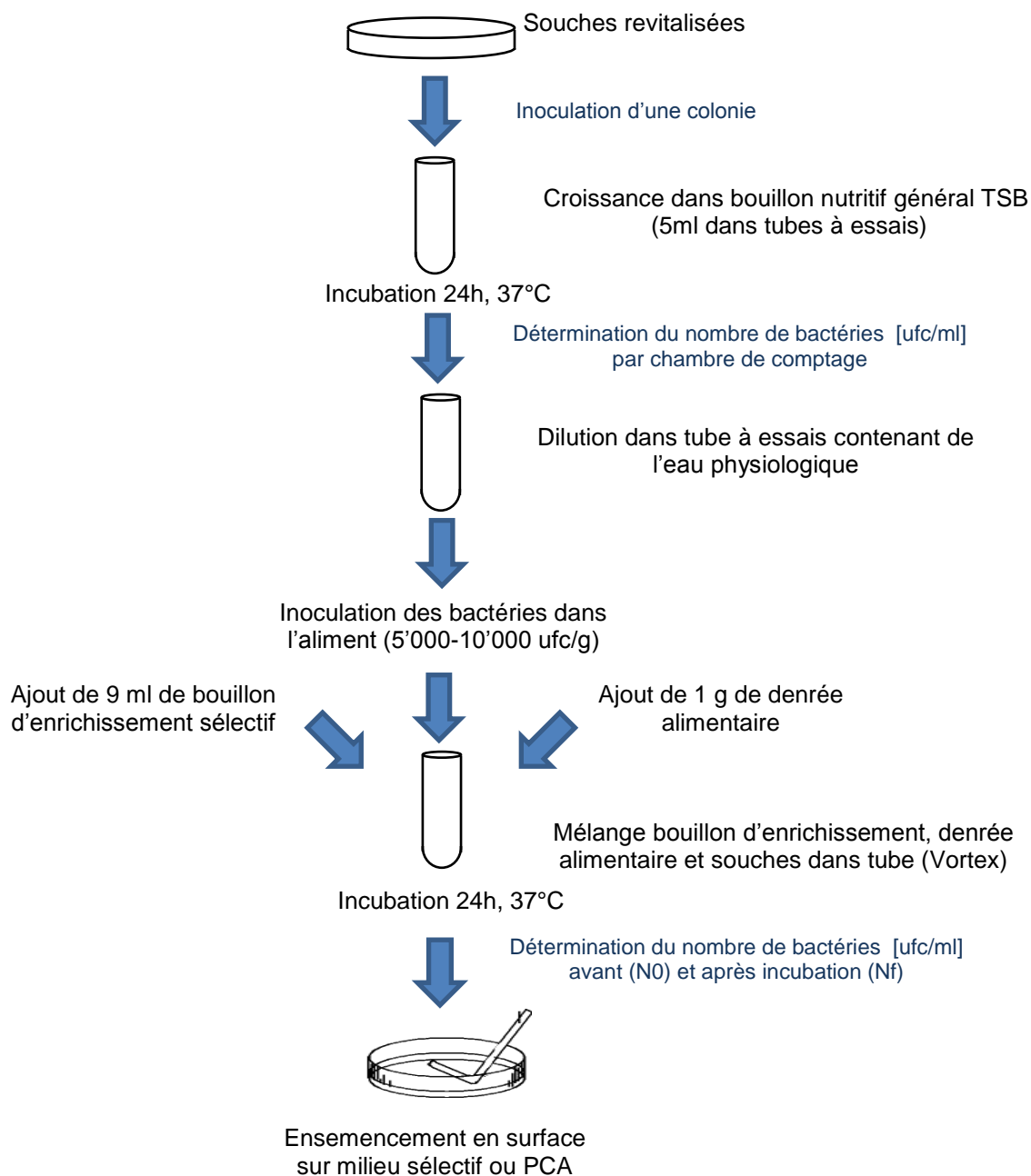
Données confidentielles

Dr Bruno Schnyder
Bruno.Schnyder@hevs.ch

Annexe 2 : Sélection du milieu d'enrichissement sélectif pour *Staphylococcus aureus*













Annexe 3 : Croissance des souches dans le milieu d'enrichissement sélectif



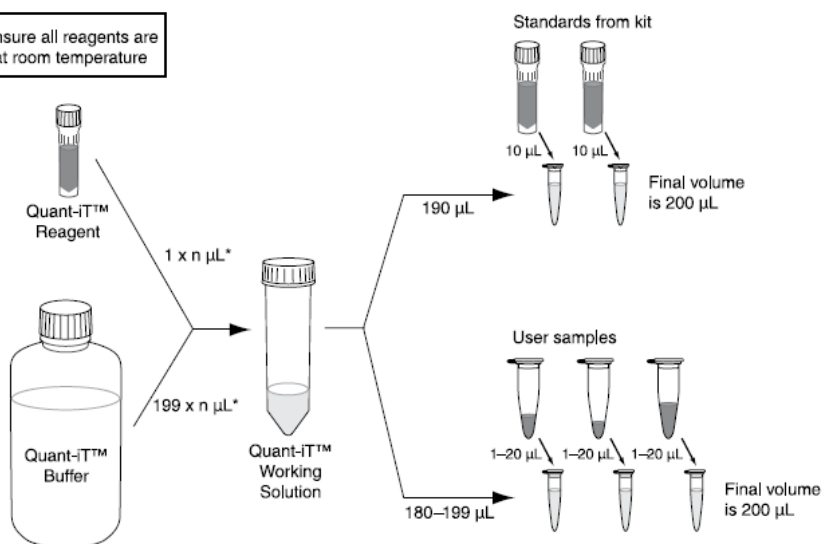
Annexe 4 : Protocole « Genomic DNA Purification from tissue »

NucleoSpin® Tissue

1	Prepare sample		Cut 25 mg into small pieces
2	Pre-lyse sample		180 µl T1 25 µl Proteinase K 56°C 1 – 3 h
3	Lyse sample		200 µl B3 70°C 10 min
4	Adjust DNA binding conditions		210 µl 96 – 100% ethanol
5	Bind DNA	 	Load all 11,000 x <i>g</i> 1 min
6	Wash silica membrane	 1 st and 2 nd 	1 st wash 500 µl BW 2 nd wash 600 µl B5 11,000 x <i>g</i> 1 min
7	Dry silica membrane		11,000 x <i>g</i> 1 min
8	Elute highly pure DNA	 	100 µl BE (70°C) RT 1 min 11,000 x <i>g</i> 1 min

Annexe 5 : Protocole « Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kits »

Ensure all reagents are at room temperature



* where n = number of standards plus number of samples

Vortex all assay tubes for 2-3 seconds

Incubate at room temperature for 2 minutes

Read tubes in Qubit™ fluorometer



Annexe 6 : Séquences des toxines (SEA à SEV)

Données confidentielles

Dr Bruno Schnyder
Bruno.Schnyder@hevs.ch

Annexe 7 : Quantité d'ADN utilisée pour les différentes souches lors des essais PCR

Souche	Quantité d'ADN extrait [$\mu\text{g/ml}$] ou [$\text{ng}/\mu\text{l}$]	
	milieu sélectif et matrice alimentaire	milieu sélectif
<i>S. aureus</i> A900322	< 0.126	-
<i>S. aureus</i> A900624	11.2	-
<i>S. aureus</i> CCM5757	8.9	3.2
<i>S. aureus</i> FRI1151m	4.0	-
<i>S. aureus</i> FRI137	< 0.126	4.5
<i>S. aureus</i> FRI913	39.3	< 0.126
<i>S. aureus</i> Fukuoka 5	6.2	-
<i>S. aureus</i> DSM1104	117.3	-
<i>S. aureus</i> DSM799	6.0	< 0.126
<i>S. capitis</i>	1.9	< 0.126
<i>S. epidermidis</i>	11.7	-
<i>S. haemolyticus</i>	9.0	< 0.126
<i>S. saprophyticus</i> spp.	9.5	-
<i>S. warneri</i>	8.3	-
<i>E. coli</i>	< 0.126	-
<i>S. typhimurium</i>	< 0.126	-
<i>L. monocytogenes</i>	< 0.126	-
<i>B. cereus</i>	< 0.126	-
<i>E. faecalis</i>	11.8	< 0.126
<i>P. aeruginosa</i>	1.3	-
<i>L. plantarum</i>	22.3	-
<i>L. casei</i>	< 0.126	-

Annexe 8 : caractérisation de la denrée alimentaire utilisée

Composition
- Lait écrémé
- Crème
- Sucre
- Amidon modifié de Tapioca
- Extrait de vanille
- Epaississant
- Bêta-carotène
PASTEURISE

pH	a _w
6.9	0.960

Annexe 9 : nombre de germes initial et final pour les différentes souches après croissance dans le milieu sélectif

- Avec matrice alimentaire

Souche	Dilution		N0 [ufc/g]
	-2	-3	
<i>S. aureus</i> A900322	81/100	10/4	$1.5 \cdot 10^4$
<i>S. aureus</i> A900624	160/132	13/20	$9.1 \cdot 10^3$
<i>S. aureus</i> CCM5757	197/163	17/15	$1.8 \cdot 10^4$
<i>S. aureus</i> FRI1151m	41/37	3/8	$3.9 \cdot 10^3$
<i>S. aureus</i> FRI137	98/85	5/5	$9.1 \cdot 10^3$
<i>S. aureus</i> FRI913	226/181	13/13	$1.9 \cdot 10^4$
<i>S. aureus</i> Fukuoka 5	140/180	18/27	$1.7 \cdot 10^4$
<i>S. aureus</i> DSM1104	17/21	9/3	$1.9 \cdot 10^3$
<i>S. aureus</i> DSM799	200/180	42/34	$2.1 \cdot 10^4$
<i>S. capitis</i>	25/16	1/0	$2.1 \cdot 10^3$
<i>S. epidermidis</i>	48/31	3/2	$3.9 \cdot 10^3$
<i>S. haemolyticus</i>	68/74	11/6	$7.3 \cdot 10^3$
<i>S. saprophyticus</i> spp.	70/84	13/17	$8.4 \cdot 10^3$
<i>S. warneri</i>	0/0	0/0	$< 1 \cdot 10^2$
<i>E. coli</i>	207/290	10/6	$2.4 \cdot 10^4$
<i>S. typhimurium</i>	85/73	12/3	$8.1 \cdot 10^3$
<i>L. monocytogenes</i>	6/6	0/0	$< 6 \cdot 10^2$
<i>B. cereus</i>	29/15	4/3	$2.2 \cdot 10^3$
<i>E. faecalis</i>	111/163	0/0	$1.4 \cdot 10^4$
<i>P. aeruginosa</i>	100/86	20/12	$9.9 \cdot 10^3$
<i>L. plantarum</i>	39/42	2/5	$4.2 \cdot 10^3$
<i>L. casei</i>	0/0	0/0	$< 1 \cdot 10^2$

Souche	Dilution						Nf [ufc/g]
	-2	-3	-4	-5	-7	-8	
<i>S. aureus</i> A900322	> 300	> 300	34/29	6/13	0/0	0/0	$3.6 \cdot 10^5$
<i>S. aureus</i> A900624	> 300	> 300	> 300	> 300	32/51	0/0	$4.1 \cdot 10^8$
<i>S. aureus</i> CCM5757	> 300	> 300	> 300	> 300	126/91	9/9	$5.1 \cdot 10^8$
<i>S. aureus</i> FRI1151m	> 300	> 300	> 300	49/71	1/1	0/0	$6 \cdot 10^6$
<i>S. aureus</i> FRI137	> 300	32/46	5/3	1/0	0/0	0/0	$3.9 \cdot 10^4$
<i>S. aureus</i> FRI913	> 300	> 300	> 300	> 300	126/91	9/9	$1.1 \cdot 10^9$
<i>S. aureus</i> Fukuoka 5	> 300	> 300	> 300	> 300	38/31	1/5	$3.5 \cdot 10^8$
<i>S. aureus</i> DSM1104	> 300	> 300	> 300	> 300	17/13	2/9	$1.5 \cdot 10^8$
<i>S. aureus</i> DSM799	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	$> 1 \cdot 10^{10}$
<i>S. capitis</i>	> 300	> 300	180/153	13/12	0/0	0/0	$1.6 \cdot 10^6$
<i>S. epidermidis</i>	> 300	> 300	> 300	> 300	23/24	7/4	$2.4 \cdot 10^8$
<i>S. haemolyticus</i>	> 300	> 300	> 300	190	2	0	$1.9 \cdot 10^6$
<i>S. saprophyticus</i> spp.	> 300	> 300	> 300	> 300	30/41	0/0	$3.5 \cdot 10^8$
<i>S. warneri</i>	> 300	> 300	65/58	9/21	0/0	0/0	$6.7 \cdot 10^8$
<i>E. coli</i>	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	$< 1.5 \cdot 10^2$
<i>S. typhimurium</i>	13/7	1/3	0/0	0/0	0/0	0/0	$1.5 \cdot 10^3$
<i>L. monocytogenes</i>	> 300	> 300	36/53	4/2	0/0	0/0	$4.5 \cdot 10^5$
<i>B. cereus</i>	1/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	< 50
<i>E. faecalis</i>	> 300	> 300	> 300	> 300	26/24	3/1	$2.5 \cdot 10^8$
<i>P. aeruginosa</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	$< 1 \cdot 10^2$
<i>L. plantarum</i>	8/5	1/2	0/0	0/0	0/0	0/0	$6.5 \cdot 10^2$
<i>L. casei</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	$< 1 \cdot 10^2$

- Sans matrice alimentaire

Souche	Dilution		N0 [ufc/g]
	-2	-3	
<i>S. aureus</i> FRI137	57/40	4/6	$4.8 \cdot 10^3$
<i>S. capitis</i>	53/57	3/4	$5.5 \cdot 10^3$
<i>S. haemolyticus</i>	11/12	1/9	$1.1 \cdot 10^3$
<i>S. aureus</i> DSM799	90/84	9/11	$8.8 \cdot 10^3$
<i>E. faecalis</i>	44/32	14/11	$4.6 \cdot 10^3$
<i>S. aureus</i> FRI913	8/12	0/0	$1.2 \cdot 10^3$
<i>S. aureus</i> CCM5757	34/37	2/3	$6.7 \cdot 10^3$

Souche	Dilution						Nf [ufc/g]
	-2	-3	-4	-5	-7	-8	
<i>S. aureus</i> FRI137	> 300	> 300	> 300	> 300	63/86	1/0	$7.4 \cdot 10^8$
<i>S. capitis</i>	> 300	> 300	> 300	24/23	1/1	0/0	$2.3 \cdot 10^6$
<i>S. haemolyticus</i>	> 300	> 300	151/176	30/14	0/0	0/0	$1.7 \cdot 10^6$
<i>S. aureus</i> DSM799	> 300	> 300	> 300	> 300	23/28	3	$2.5 \cdot 10^8$
<i>E. faecalis</i>	16/18	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	$1.7 \cdot 10^3$
<i>S. aureus</i> FRI913	> 300	> 300	> 300	> 300	16	0/0	$1.6 \cdot 10^8$
<i>S. aureus</i> CCM5757	> 300	> 300	> 300	> 300	78	2	$7.8 \cdot 10^8$

Annexe 10 : Quantité d'ADN extraite en fonction du nombre de germes présents lors de l'extraction

- Milieu TSB + 15% NaCl et matrice alimentaire

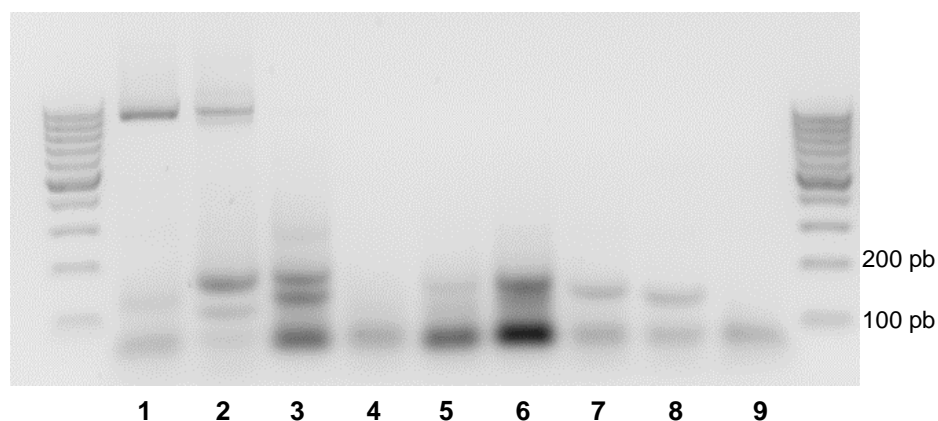
Souche	Nombre de germes [ufc/g]	Quantité d'ADN extrait [µg/ml] ou [ng/µl]
<i>S. aureus</i> A900322	$3.6 \cdot 10^5$	< 0.010
<i>S. aureus</i> A900624	$4.1 \cdot 10^8$	0.887
<i>S. aureus</i> CCM5757	$5.1 \cdot 10^8$	0.708
<i>S. aureus</i> FRI1151m	$6 \cdot 10^6$	0.318
<i>S. aureus</i> FRI137	$3.9 \cdot 10^4$	< 0.010
<i>S. aureus</i> FRI913	$1.1 \cdot 10^9$	3.12
<i>S. aureus</i> Fukuoka 5	$3.5 \cdot 10^8$	0.496
<i>S. aureus</i> DSM1104	$1.5 \cdot 10^8$	9.31
<i>S. aureus</i> DSM799	$> 1 \cdot 10^{10}$	0.475
<i>S. capitis</i>	$1.6 \cdot 10^6$	0.149
<i>S. epidermidis</i>	$2.4 \cdot 10^8$	0.929
<i>S. haemolyticus</i>	$1.9 \cdot 10^6$	0.711
<i>S. saprophyticus</i> spp.	$3.5 \cdot 10^8$	0.752
<i>S. warneri</i>	$6.7 \cdot 10^8$	0.656
<i>E. coli</i>	$< 1.5 \cdot 10^2$	< 0.010
<i>S. typhimurium</i>	$1.5 \cdot 10^3$	< 0.010
<i>L. monocytogenes</i>	$4.5 \cdot 10^5$	< 0.010
<i>B. cereus</i>	< 50	< 0.010
<i>E. faecalis</i>	$2.5 \cdot 10^8$	0.937
<i>P. aeruginosa</i>	$< 1 \cdot 10^2$	0.104
<i>L. plantarum</i>	$6.5 \cdot 10^2$	1.77
<i>L. casei</i>	$< 1 \cdot 10^2$	< 0.010

- Milieu TSB + 15% NaCl

Souche	Nf [ufc/g]	Quantité d'ADN extrait [µg/ml] ou [ng/µl]
<i>S. aureus</i> FRI137	$7.4 \cdot 10^8$	0.360
<i>S. capitis</i>	$2.3 \cdot 10^6$	< 0.010
<i>S. haemolyticus</i>	$1.7 \cdot 10^6$	< 0.010
<i>S. aureus</i> DSM799	$2.5 \cdot 10^8$	< 0.010
<i>E. faecalis</i>	$1.7 \cdot 10^3$	< 0.010
<i>S. aureus</i> FRI913	$1.6 \cdot 10^8$	< 0.010
<i>S. aureus</i> CCM5757	$7.8 \cdot 10^8$	0.250

Annexe 11 : Résultats pour l'optimisation de la PCR avec la bétaine

N°	Echantillon	N°	Echantillon
1	<i>S. aureus</i> CCM5757 + DA	6	<i>L. plantarum</i> + DA
2	<i>S. aureus</i> CCM5757	7	Plasmide K
3	<i>S. aureus</i> CCM5757 + M	8	Plasmide Q
4	<i>E. faecalis</i> + DA	9	Contrôle
5	<i>E. faecalis</i> + M		

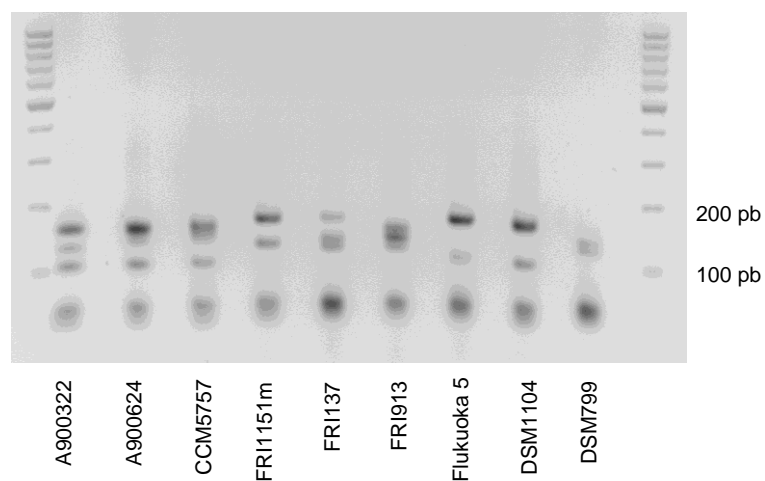


Annexe 12 : résultats obtenus pour la real-time PCR

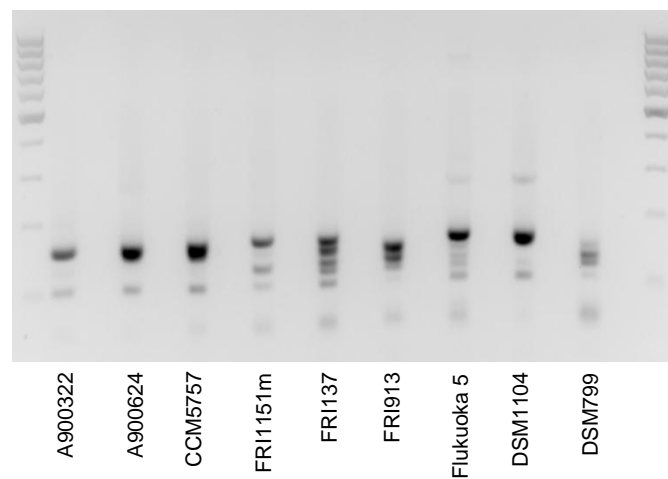
- Souches *S. aureus*

qPCR

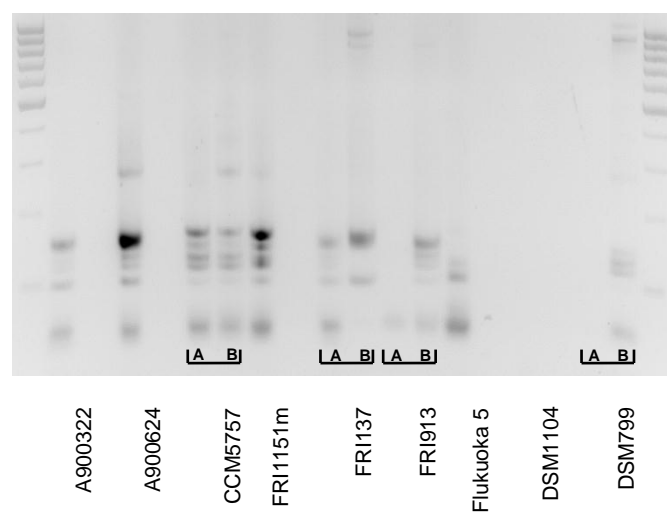
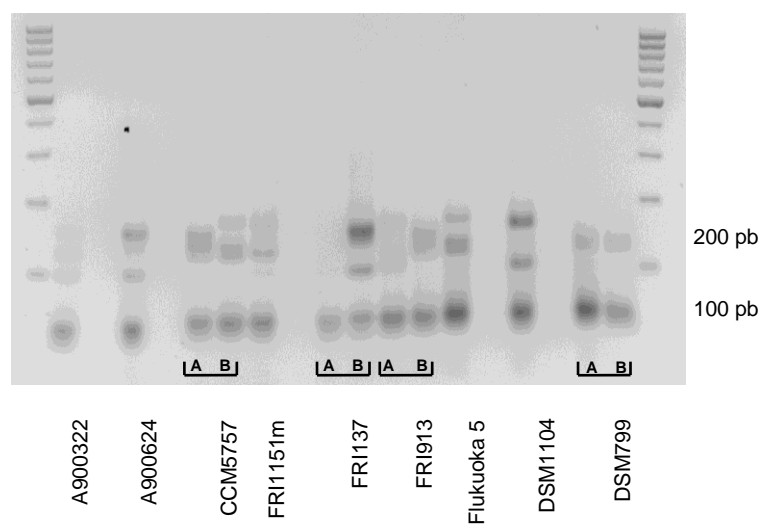
Milieu TSB



PCR



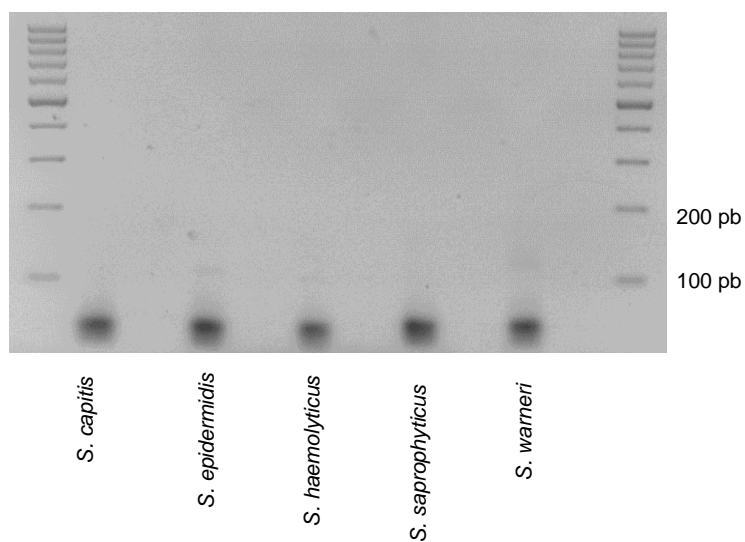
Milieu TSB + 15% NaCl



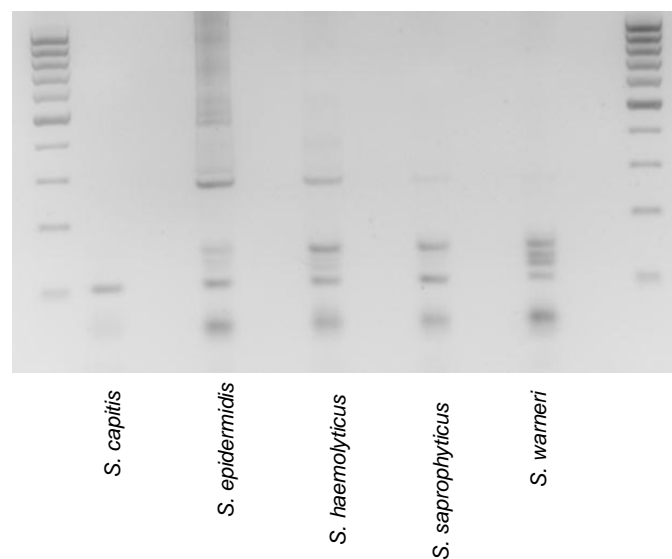
- Souches *S. non aureus*

qPCR

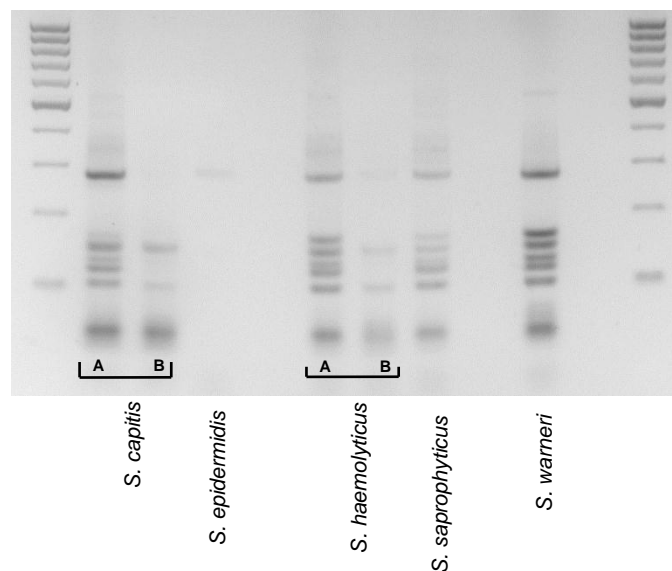
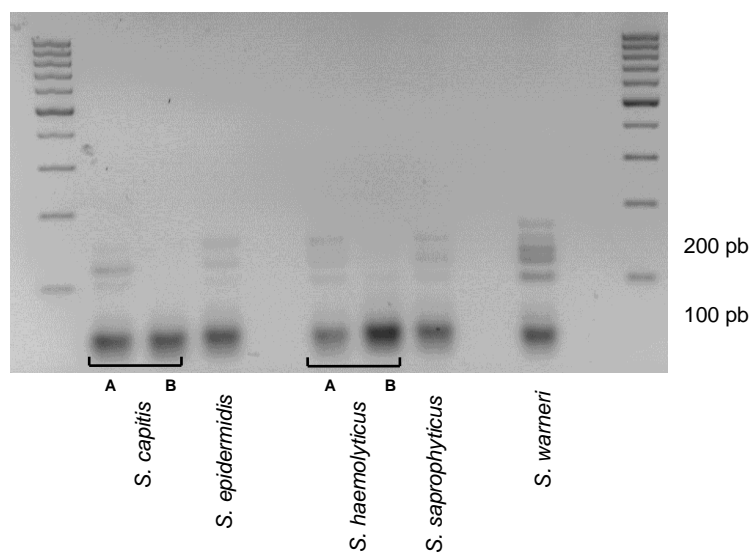
Milieu TSB



PCR



Milieu TSB + 15% NaCl

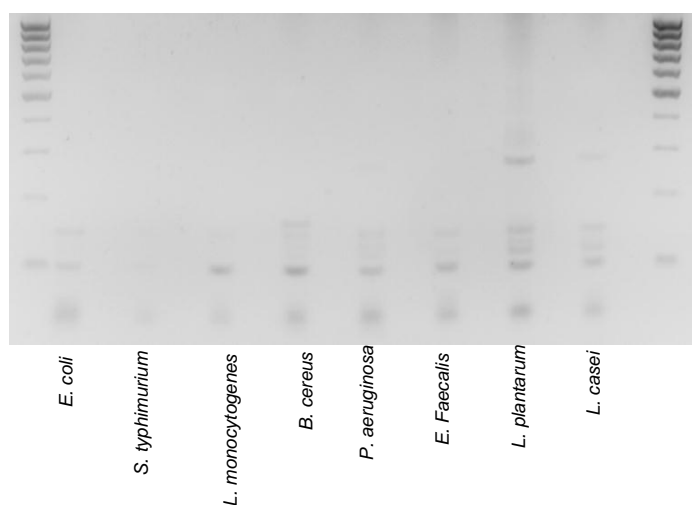
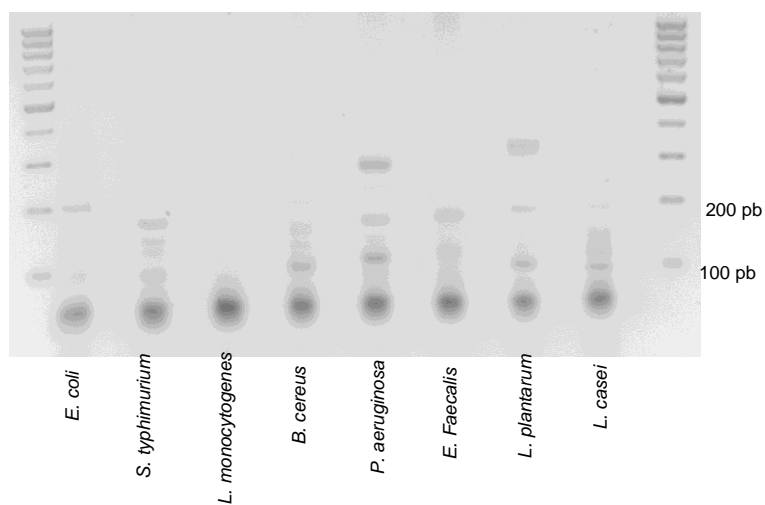


- Souches non *S. aureus*

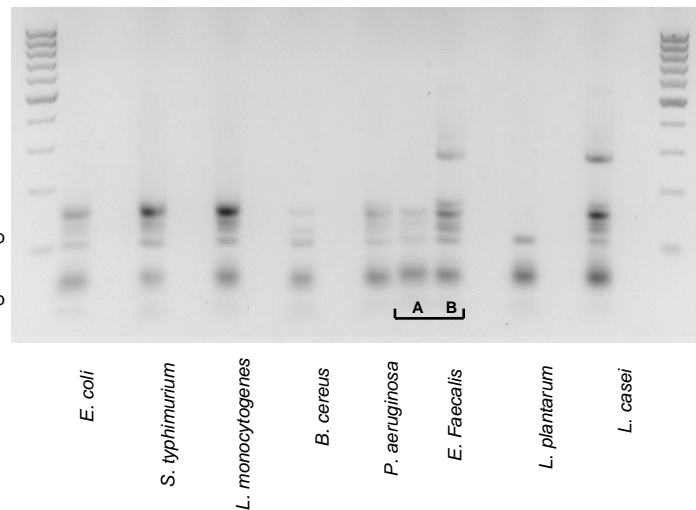
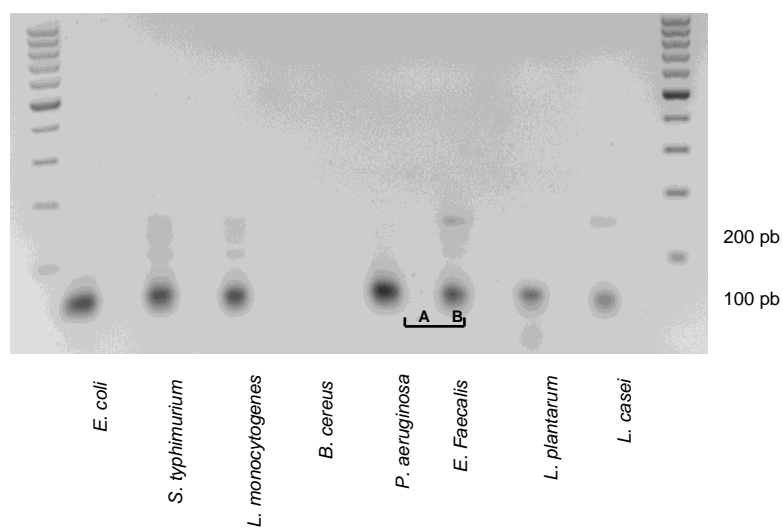
qPCR

Milieu TSB

PCR



Milieu TSB + 15% NaCl



Annexe 13 : facteur de sélectivité des milieux d'enrichissement sélectif à *S. aureus*

Table 1
Selective and diagnostic systems used in enrichment media for *Staphylococcus aureus*

Enrichment broth	Selective system	Diagnostic system	Reference
Tryptone soya broth (TSB) with sodium chloride (TSBS)	Sodium chloride		Buttiaux and Brogniart (1947) Baer (1966) Gilden et al. (1966)
TSB with sodium chloride and 1% sodium pyruvate (PTSBS)	Sodium chloride		Lancette et al. (1986)
Giolitti and Cantoni Broth (GCB)	Potassium tellurite Lithium chloride Glycine Anaerobic incubation	Potassium tellurite	Giolitti and Cantoni (1966)
Liquid Baird-Parker (LBP)	Potassium tellurite Lithium chloride Glycine Anaerobic incubation	Potassium tellurite	Baird and van Doorne (1982)

R. M. Baird & W. H. Lee /Int. J. Food Microbiology, 26, (1995), 15-24